



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS DE LUGO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA

**Estudio de la composición
polifenólica de vinos tintos
gallegos con D.O.: Ribeiro,
Valdeorras y Ribeira Sacra.**

SANDRA REBOLO LÓPEZ
LUGO, 2007

ÍNDICE

Parte teórica

1.- Vino y salud.....	1
1.1.- Definición de vino	3
1.2.- Denominación de Origen.....	3
1.2.1.- Características de las denominaciones de origen estudiadas	4
1.3.- Polifenoles y antocianinas.....	9
1.3.1.- Clasificación de los polifenoles.....	10
1.3.1.1.- Fenoles no flavonoides	12
1.3.1.2.- Fenoles flavonoides	16
1.3.2.- Contenido polifenólico y actividad antioxidante	29

Objetivos

2.1.- Objetivos	35
-----------------------	----

Parte experimental

3.1.- Patrones y otros reactivos utilizados.....	37
3.1.1.- HPLC y HPLC/MS	37
3.1.2.- Fenoles totales	38
3.1.3.- Actividad antioxidante.....	38
3.2.- Preparación de disoluciones	39
3.2.1.- HPLC y HPLC/MS	39
3.2.2.- Fenoles totales	40
3.2.3.- Actividad antioxidante.....	41
3.3.- Equipo y material utilizado	41
3.3.1.- HPLC y HPLC/MS	41
3.3.2.- Fenoles totales y actividad antioxidante	43

Separación de polifenoles

4.1.- HPLC.....	45
4.2.- HPLC/MS	62
4.3.- Estudio de la repetibilidad de los métodos optimizados	70
4.3.1.- HPLC	71
4.3.2.- HPLC/MS.....	72
4.4.- Estudio del rango de linealidad	73
4.4.1.- HPLC	73
4.4.2.- HPLC/MS.....	77
4.5.- Límites de detección y cuantificación	81
4.5.1.- HPLC	82
4.5.2.- HPLC/MS.....	83

Aplicación del método a vinos tintos

5.1.- Tratamiento de las muestras	85
5.2.- Tratamiento de datos.....	85
5.2.1.- HPLC	85
5.2.2.- HPLC/MS	87
5.3.- Muestras.....	89
5.4.- Resultados y discusión	92
5.4.1.- HPLC	92
5.4.2.- HPLC/MS	99
5.4.3.- Identificación de otros polifenoles	118

Análisis de fenoles totales y de la actividad antioxidante

6.1.- Método de análisis de fenoles totales.....	127
6.2.- Método de análisis de la actividad antioxidante.....	128
6.3.- Resultados y discusión	129

Estudio quimiométrico

7.1.- Técnicas quimiométricas	137
7.2.- Estudio quimiométrico de vinos tintos gallegos	144
7.2.1.- Estudio univariante	144
7.2.2.- Análisis de clusters	151
7.2.3.- Análisis de componentes principales	156
7.3.- Discusión de resultados	160

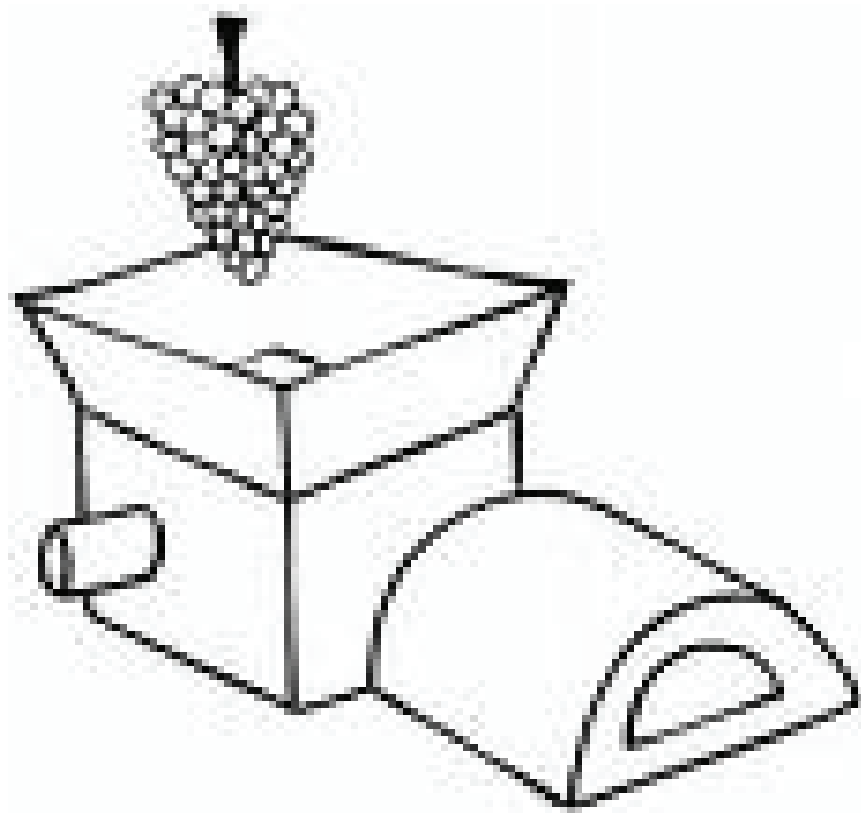
Conclusiones

8.1.- Conclusiones	163
--------------------------	-----

Bibliografía

9.1.- Bibliografía.....	165
-------------------------	-----

1. PARTE TEÓRICA



Los constituyentes fenólicos revisten una gran importancia en enología debido al papel que juegan directa o indirectamente sobre la calidad de los vinos. Estos compuestos participan en una serie de reacciones en las que en ocasiones se transforman y evolucionan provocando mejoras importantes en la calidad del vino, mientras que otras veces sufren alteraciones perjudiciales.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con sistema de detección Array de Diodos es un instrumento muy poderoso para llevar a cabo el estudio de dichos compuestos polifenólicos. Sin embargo, debido a que estos compuestos presentan tiempos de retención y espectros de absorción muy similares, se han complementado dichos estudios con la utilización de una herramienta analítica más poderosa: la Cromatografía Líquida acoplada a la Espectrometría de Masas (HPLC/MS).

Una de las propiedades esenciales de los compuestos fenólicos de las plantas es que son antioxidantes [1], tienen capacidad para fijarse a los radicales libres y así neutralizan la oxidación de los componentes orgánicos que causarían dichos radicales. Entre las bebidas, el vino tinto se ha revelado como el mejor agente protector comparado con otras bebidas alcohólicas.

1- VINO Y SALUD

El vino ha sido parte de la cultura humana desde hace unos 6000 años y los antecedentes históricos relacionan al vino con la salud y la longevidad, sobre todo en la cultura mediterránea. Efectivamente, en varios países del área mediterránea (Francia, España, Portugal, Italia y Grecia) el vino está integrado en el comportamiento habitual de los pueblos que lo consumen con las comidas y en las celebraciones [2].

El vino es un producto natural obtenido por fermentación directa de la uva o de su mosto; contiene alcohol y múltiples productos secundarios de su fermentación alcohólica, pero contiene además otras muchas sustancias procedentes de la uva, en las que radica especialmente su valor desde el punto de vista de la salud.

En los últimos años han surgido una serie de estudios científicos [3-5] que muestran que beber moderadamente es beneficioso para la salud, en especial para la prevención de las enfermedades coronarias. En general, se encuentra una disminución del riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria de aproximadamente 30%-40% y de 10%-20% para mortalidad general, en bebedores hombres o mujeres [6-12]. Este efecto beneficioso sería debido a que en la elaboración del vino tinto se incorporan la semilla y la piel de la uva, ambas con altas concentraciones de flavonoides, principalmente catequina, ácido gálico y epicatequina. Experiencias *in vitro* demostraron que dichos flavonoides poseen una capacidad antioxidante varias

veces superior a la de las vitaminas E y C; *in vivo*, la situación varía debido a que la absorción intestinal modifica la constitución y la velocidad de acción de estos compuestos.

Los datos disponibles indican que el efecto protector del vino sería superior al de otras bebidas alcohólicas [13-16], porque reúne los efectos del propio etanol y los compuestos no alcohólicos (polifenólicos) que contiene. Para explicar la menor incidencia de enfermedades de los consumidores regulares y moderados de vino se proponen básicamente tres mecanismos. Dos de ellos se deben principalmente al alcohol: uno mediado por la acción del alcohol sobre los niveles de lipoproteínas presentes en la sangre y el otro mediado por su influencia sobre la coagulación sanguínea. El tercer mecanismo estaría mediado por la capacidad de los componentes antioxidantes del vino (polifenoles), que protegen de la oxidación a las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de acuerdo con la hipótesis oxidativa de aterogénesis [17].

Según el estado actual de las investigaciones, se deduce que los beneficios que el vino aporta a la salud humana son [18] :

1. Acción antiespasmódica
2. Activación de la secreción biliar
3. Acción antibacteriana [19, 20]
4. Efecto antihistamínico, que atenúa las reacciones alérgicas
5. Protección de las paredes arteriales, al fortalecer el colágeno y la elastina que las forman [21-23]
6. El vino aporta minerales y oligoelementos
 - Magnesio: disminuye el estrés
 - Zinc: mejora las defensas inmunitarias
 - Litio: equilibra el sistema nervioso
 - Calcio y potasio: garantizan un adecuado equilibrio iónico y eléctrico
7. Se recomienda en casos de anemia ya que el vino contiene siempre algunos miligramos por litro de hierro
8. Acción fungicida [24]
9. Efectos positivos sobre la enfermedad de Alzheimer [25]

R. Estruch [26] dice que por el momento el vino se sigue considerando como un alimento y en su elaboración deben prevalecer las características organolépticas. No obstante, puede que en un futuro no muy lejano en la etiqueta de la botella figure también su composición polifenólica, de modo que el consumidor pueda tener en cuenta las “propiedades medicinales” de los polifenoles que contenga a la hora de escoger un vino para su consumo.

1.1- DEFINICION DE VINO

El vino se define como el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva [27].

Según el nivel de requisitos que cumplan y, en su caso, de conformidad con la legislación autonómica, los vinos elaborados en España podrán acogerse a alguno de los siguientes niveles:

- a) Vinos de mesa:
 - 1º) Vinos de mesa.
 - 2º) Vinos de mesa con derecho a la mención tradicional de “vino de la tierra”.
- b) Vinos de calidad producidos en una región determinada (v.c.p.r.d.), en los que, a su vez, podrán establecerse los siguientes niveles:
 - 1º) Vinos de calidad con indicación geográfica.
 - 2º) Vinos con denominación de origen.
 - 3º) Vinos con denominación de origen calificada.
 - 4º) Vinos de pagos.

1.2- DENOMINACION DE ORIGEN

Según la Ley 24/2003, de 10 de julio, se entenderá por “denominación de origen” el nombre de una región, comarca, localidad o lugar determinado que haya sido reconocido administrativamente para designar vinos que cumplan las siguientes condiciones:

1. Haber sido elaborados en la región, comarca, localidad o lugar determinados con uvas procedentes de los mismos.
2. Disfrutar de un elevado prestigio en el tráfico comercial en atención a su origen.
3. Y cuya calidad y características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico que incluye los factores naturales y humanos.

Será requisito necesario para el reconocimiento de una denominación de origen que la región, comarca o lugar a la que se refiera hayan sido reconocidos previamente como ámbito geográfico de un vino de calidad con una antelación de, al menos, cinco años.

La delimitación geográfica de una denominación de origen incluirá exclusivamente terrenos de especial aptitud para el cultivo de la vid.

La gestión de la denominación de origen deberá estar encomendada a un órgano denominado Consejo Regulador, en la forma que la normativa de la Administración Pública competente determine.

En Galicia actualmente existen cinco denominaciones de origen: **Ribeiro, Valdeorras, Ribeira Sacra, Rías Baixas y Monterrei** (Fig. 1).

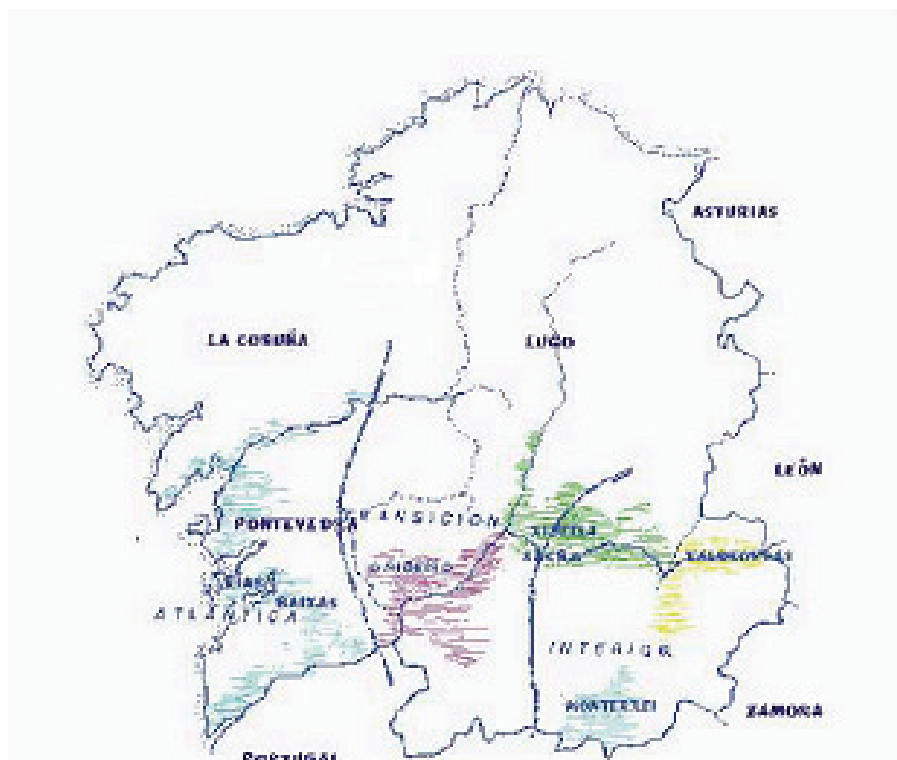


Fig. 1 Denominaciones de origen

1.2.1- CARACTERÍSTICAS DE LAS DENOMINACIONES DE ORIGEN ESTUDIADAS

A continuación se describen las características de las tres denominaciones de origen estudiadas.

Denominación de origen Ribeira Sacra

Esta denominación de origen es de reciente creación, aunque históricamente sus vinos fueron muy valorados cualitativamente, especialmente los tintos, que gozan aún hoy en día de una gran tradición.

El reglamento fue aprobado por Orden de la Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria del 3 de septiembre de 1996 [28]. Fue ratificado por el MAPA por Orden del 11 de septiembre de 1997 [29], y modificado por la Orden del 29 de agosto de 2002 de la Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria [30], y por la Orden del 14 de julio de 2006 de la Consellería do Medio Rural [31].

La zona de producción de los vinos amparados por la denominación de origen Ribeira Sacra está constituida por varias subzonas y ayuntamientos situados en el sur de la provincia de Lugo y en el norte de la de Ourense, en las riberas de los ríos Sil, Miño y sus afluentes.

Se diferencian 5 subzonas: *Chantada*, *Quiroga-Bibei*, *Ribeiras do Miño*, *Amandi* y *Ribeiras do Sil*.



Fig. 2 Mapa de las subzonas de la D.O. Ribeira Sacra

Los climas son muy diferentes entre el Valle del Sil y el Valle del Miño. El Valle del Sil participa de las características climáticas de la Región Interior, aunque en el invierno se puede considerar más propio de la Región Atlántica del Interior. El Valle del Miño posee unas características intermedias entre la Región Atlántica de

Transición y la Interior, y es producto de una posición geográfica parecida a las del Ribeiro, dominada por la Cordillera Dorsal Gallega.

En la Ribeira Sacra no hay un suelo uniforme, aunque la característica común es una elevada acidez, excepto en pequeñas áreas no vinícolas del Valle del Cabe, debido a los arrastres del río del mismo nombre.

Una de las condiciones principales para conseguir vinos de calidad es el tipo de uva. La mano del hombre puede influir en otras variables, mediante la poda, abonado, tratamientos fitosanitarios, tecnología enológica..., pero la intervención de la vinífera es fundamental, ya que el vino presentará las características que le traslade la uva, con sus virtudes y defectos. Todas las denominaciones establecen cuáles son las variedades permitidas en cada una de las zonas de producción, diferenciando además las principales, para las que se prescribe un porcentaje mínimo de empleo en la elaboración de los vinos monovarietales, y las complementarias, que combinan con las preferentes. Las variedades autorizadas en la denominación de origen Ribeira Sacra, son las siguientes:

Blancas preferentes: *Loureira, Treixadura, Godello, Dona Branca, Albariño y Torrontés*.

Tintas preferentes: *Mencía, Brancellao y Merenzao*.

Tintas autorizadas: *Sousón, Caiño tinto, Garnacha tintureira, Mouratón (Negreda) y Tempranillo*.

El Consejo Regulador podrá proponer a la Consejería competente en materia de agricultura que se autoricen nuevas variedades, luego de los ensayos y experiencias convenientes y tras comprobar que producen mostos de calidad aptos para la elaboración de vinos protegidos, determinándose en cada caso su inclusión como preferente o como autorizada.

Los tipos de vino amparados por la denominación de origen Ribeira Sacra, y las características que deben reunir son las siguientes:

1. Serán Ribeira Sacra SÚMMUM:
 - a) Los tintos elaborados, como mínimo, con un 85% de una de las variedades tintas preferentes.
 - b) Los tintos elaborados, como mínimo, con un 85% de las variedades tintas preferentes, siendo la variedad mencía, por lo menos, un 60% del total.
 - c) Los blancos elaborados con las variedades blancas preferentes.
2. Serán Ribeira Sacra:
 - a) Los tintos elaborados, como mínimo, con un 70% de variedades tintas preferentes.
 - b) Los súmmum que no alcancen los niveles analíticos u organolépticos exigidos para esa mención.

Sólo podrán hacer referencia a las variedades los vinos Ribeira Sacra Súmmum. Cuando se mencione una variedad, el vino deberá estar elaborado con un 85%, como mínimo, de esa variedad.

Los vinos tintos Ribeira Sacra Súmmum poseen una graduación alcohólica mínima del 11% Vol. con una acidez total de 4.5 a 6.5 g/L. Los blancos Ribeira Sacra Súmmum tienen una graduación alcohólica mínima del 11% Vol. con una acidez total de 4.5 a 7.0 g/L. Los vinos Ribeira Sacra poseen una graduación alcohólica mínima del 10% Vol. con una acidez total de 4.5 a 7.0 g/L.

Denominación de origen Ribeiro

El Reglamento de esta denominación de origen fue aprobado por Orden Ministerial el 2 de febrero de 1976 [32] y fue modificado por Orden de 19 de abril de 2004 de la Consellería de Política Agroalimentaria e Desenvolvemento Rural [33].

La zona de producción de los vinos amparados por esta denominación de origen está constituida por los Ayuntamientos de *Ribadavia*, *Arnoia*, *Castrelo de Miño*, *Carballeda de Avia*, *Leiro*, *Cenlle*, *Begade*, *Punxín* y *Cortegada*, y por varias parroquias de los Ayuntamientos de *Carballiño*, *Boborás*, *Ourense*, *Toén* y *San Amaro*, todos ellos de la provincia de Ourense.

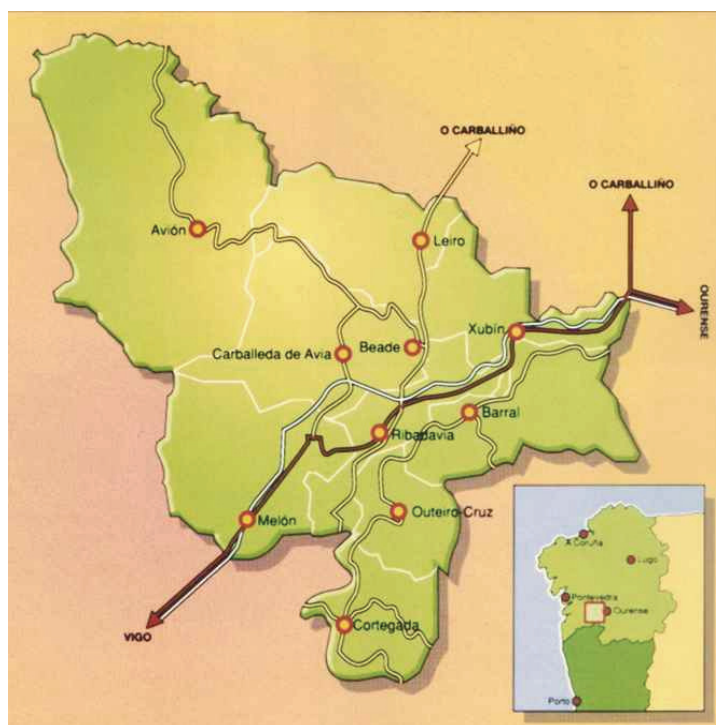


Fig. 3 Mapa de la D.O. Ribeiro

Para su elaboración se utilizan las variedades autóctonas tradicionales, que son:

Blancas preferentes: *Treixadura, Torrontés, Loureira, Godello y Albariño*.

Tintas preferentes: *Sousón, Brancellao, Caíño, Ferrón Y Mencía*.

Blancas autorizadas: *Palomino, Albilla y Macabeo*.

Tintas autorizadas: *Garnacha y Tempranillo*.

Los tipos de vinos son blancos y tintos. Los vinos blancos poseen una graduación alcohólica del 9 al 13% Vol. con una acidez total de 4 a 9 g/L. Los tintos tienen una graduación alcohólica del 9 al 12% Vol. con una acidez volátil de 5 a 10 g/L.

Denominación de origen Valdeorras

El Reglamento de esta denominación de origen fue aprobado por Orden Ministerial el 2 de Febrero de 1977 [34] y fue modificado por Orden de 18 de febrero de 2000 de la Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria [35].

La zona de producción de vinos amparados por esta denominación de origen está constituida por los Ayuntamientos de *O Barco de Valdeorras, O Bolo, Carballada de Valdeorras, Larouco, Petín, A Rúa y Vilamartín de Valdeorras*, todos ellos al Noroeste de la provincia de Ourense.



Fig. 4 Mapa de la D.O. Valdeorras

Las variedades de vid más características son:

Blancas preferentes: *Godello*.

Tintas preferentes: *Mencia*.

Blancas autorizadas: *Dona Branca y Palomino*.

Tintas autorizadas: *Garnacha o Alacante, Gran Negro, María Ardoña o Merenzao*.

Los tipos de vinos son blancos y tintos monovarietales. Los vinos blancos monovarietales poseen una graduación alcohólica mínima del 9% Vol. con una acidez total de 5.5 g/L. Los tintos monovarietales tienen una graduación alcohólica mínima del 9 % Vol. con una acidez total de 4.5 g/L. Además de éstos , hay vinos blancos, tintos y rosados que no son monovarietales y que proceden de las respectivas variedades autorizadas.

1.3- POLIFENOLES Y ANTOCIANINAS

Los compuestos polifenólicos agrupan un conjunto de sustancias que durante mucho tiempo fueron denominadas genéricamente "*Materias tanoides o Taninos*".

Son compuestos que se encuentran muy difundidos en la naturaleza y juegan un papel muy importante en los caracteres organolépticos o sensoriales de los alimentos. Sufren modificaciones con mucha facilidad, como las oxidaciones que contribuyen al envejecimiento y madurez del vino, desarrollándose así su buen sabor a la vez que evitan la oxidación de otros componentes del mismo, que darían compuestos contrarios a la buena calidad [36]. Sufren también complejaciones con metales y cambios debidos a modificaciones del pH, por lo que participan en procesos que dan lugar a cambios organolépticos en muchos alimentos.

Su importancia en enología es muy significativa, ya que entre estas sustancias se encuentran las responsables en mayor medida del color de las uvas (particularmente de las tintas o negras), jugando un importante papel en la evolución de los vinos con el envejecimiento.

En el caso del vino también son los responsables de la sensación de astringencia en la lengua y de la sensación que se nota en la boca (impresión táctil de los vinos). Además contribuyen al sabor, especialmente a los sabores amargos y a la apreciación organoléptica, distinguiéndose así un vino blanco de uno tinto no sólo por su sabor sino también por su olor.

Otras propiedades que tienen los polifenoles son [37]:

- Propiedades bactericidas o bacteriostáticas, frente a microorganismos patógenos que produciendo alteraciones fisiológicas se desarrollan,

ocasionalmente, en el aparato digestivo y, de manera particular, en el intestino.

- Propiedades antitóxicas, de manera concreta frente a la toxicidad de los alcoholes, demostrada experimentalmente en ensayos con animales de laboratorio.
- Valor vitamínico P, frente a la fragilidad de los vasos sanguíneos capilares, que pueden ocasionar hemorragias en estos conductos.

Parece ser que, en buena parte, las propiedades fisiológicas apuntadas residen en el carácter de tanino que presentan, por polimerización, una parte de estas sustancias, siendo los efectos más apreciables a mayores contenidos, es decir, en los vinos tintos.

Los polifenoles del vino varían desde compuestos relativamente sencillos producidos por las vides, hasta sustancias sumamente complejas formadas durante el envejecimiento, así como otras extraídas por el vino de la madera de los barriles. Proviene básicamente de las partes sólidas de la uva, y en menor medida de la pulpa, siendo su aportación diferente según procedan de hollejos, pepitas o raspones, ya que la composición polifenólica del vino varía según el tiempo de contacto de cada una de estas partes con el mosto [38].

Así la composición polifenólica final, no es únicamente un reflejo de los polifenoles encontrados en la variedad de uva de la cual proceda el vino [39], ya que es en último término la técnica de elaboración (tratamiento mecánico aplicado para obtener el mosto, tipo de vinificación y envejecimiento) lo que condiciona la amplia variación en el contenido de polifenoles de un vino [37, 40].

Resulta por tanto lógico relacionar composición polifenólica con caracterización de vinos, ya que vinos procedentes de distintas zonas, con distinto tipo de cepa y sometidos a procesos de elaboración y conservación distintos según las costumbres vinícolas, tendrán diferente composición polifenólica [41].

1.3.1- CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES

Como puede observarse en la Fig. 5, la biosíntesis de compuestos fenólicos es consecuencia de la formación y acumulación de azúcares en el grano de uva. A partir de las hexosas y por el ciclo de las pentosas-fosfato, se forma eritrosa-4-fosfato como compuesto intermedio, del cual por la vía del ácido siquímico se forman

los ácidos benzoicos y aminados, terminando en la formación de otros polifenoles (flavonas, antocianos, flavonoles, taninos, etc.). Por otra parte en la glicólisis, a partir de tres moléculas de ácido pirúvico, se puede formar una molécula de ciclo bencénico, dando lugar posteriormente a los mismos compuestos anteriormente citados [42].

Cada etapa metabólica necesita la presencia de un enzima específico, por lo que una determinada variedad de uva, por ejemplo, se podría identificar por su capacidad de sintetizar compuestos polifenólicos en función de su patrimonio enzimático [43]. Además de la variedad del fruto, el clima puede ejercer una influencia importante. Los flavonoides parecen variar más que los no flavonoides con respecto al lugar, la cosecha y las variaciones climáticas.

El estudio de los compuestos fenólicos preocupa desde hace mucho tiempo a los investigadores. Se deben a Ribéreau-Gayon y col. [44, 45] los primeros avances determinantes sobre este tema. Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: **FENOLES FLAVONOIDES y FENOLES NO FLAVONOIDES.**

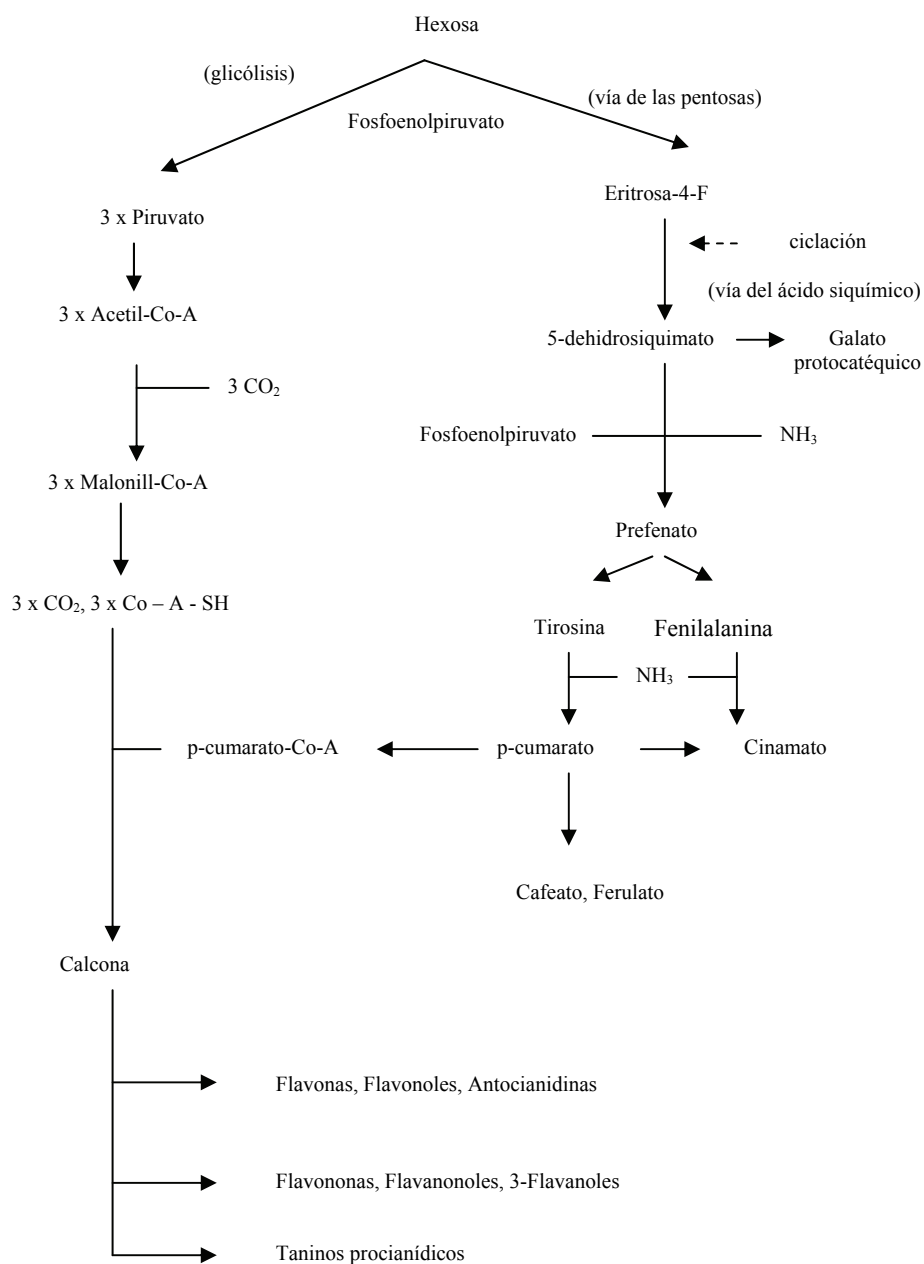


Fig. 5 Biosíntesis de los polifenoles

1.3.1.1- FENOLES NO FLAVONOIDES

Esta denominación abarca a los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos.

1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos son incoloros, inodoros e insípidos, aunque con el tiempo y la oxidación pueden tornarse de color amarillo, así como también, bajo la acción de algunos microorganismos, pueden transformarse en fenoles volátiles, que presentan olores muy característicos.

Los vinos tintos contienen mayor cantidad de ácidos fenólicos que los blancos encontrándose en concentraciones de 10 a 20 mg/L en los blancos y de 100 a 200 mg/L en los tintos.

Se caracterizan por la presencia de un solo anillo bencénico en su molécula y se clasifican en dos grupos:

A) Ácidos benzoicos

Se consideran derivados del ácido p-hidroxibenzoico y son los siguientes:

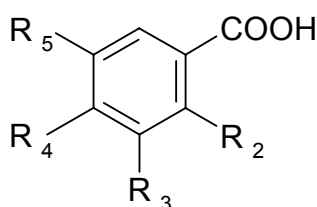


Fig. 6 Estructura química de los ácidos benzoicos de mayor importancia enológica

Tabla 1. Ácidos benzoicos más importantes

Nombre del ácido benzoico	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H
protocatéquico	H	OH	OH	H
vanílico	H	OCH ₃	OH	H
gálico	H	OH	OH	OH
siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
salicílico	OH	H	H	H
gentísico	OH	H	H	OH

Entre los distintos autores existe una cierta discusión acerca de si estos ácidos se hallan libres en la uva o si son liberados en el curso de la vinificación. Parece demostrado que existen en forma esterificada y que son liberados por hidrólisis alcalina en el curso de la elaboración y conservación del vino [46].

Otros autores sugieren que su presencia en uvas y vinos, se debe en parte a una degradación de los ácidos cinámicos por hidrólisis durante la manipulación de la uva [47].

Las formas libres de estos compuestos son más comunes sobre todo en el vino tinto, debido a la hidrólisis de esas combinaciones y a las reacciones de degradación de las moléculas más complejas, en particular las antocianinas, bajo la acción del calor [48].

B) Ácidos cinámicos

Se caracterizan por poseer una estructura C_6-C_3 . Los ácidos cinámicos de mayor importancia enológica son:

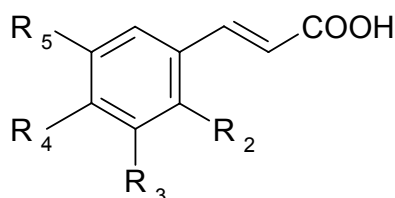


Fig. 7 Estructura química de los ácidos cinámicos de mayor importancia enológica

Tabla 2. Ácidos cinámicos más importantes

Nombre del ácido cinámico	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
p-cumárico	H	H	OH	H
cafeico	H	OH	OH	H
ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Debido a la presencia del doble enlace existen dos formas isoméricas. La más frecuente en la naturaleza es la forma trans, ya que es termodinámicamente la más estable, pero se isomeriza fácilmente por acción de la luz. Los isómeros cis, largo tiempo confundidos con los derivados glucosilados, también existen aunque en débil cantidad [49].

Varios ácidos cinámicos están presentes en la uva y en el vino. Se los identifica en pequeña cantidad bajo forma libre, pero están sobre todo esterificados (Fig. 8), en su mayor parte con ácido tartárico [45]. Estos son los ácidos cafeoil tartárico o caftárico, p-cumaroil tartárico o cutárico y feruloil tartárico o fertárico.

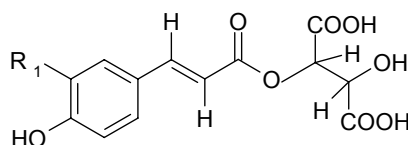


Fig. 8 Ésteres hidroxicinámicos de la uva

Tabla 3. Ésteres hidroxicinámicos

Ésteres hidroxicinámicos	R ₁
ácido cafeoil tartárico	OH
ácido p-cumaroil tartárico	H
ácido feruloil tartárico	OCH ₃

Los ésteres con el ácido tartárico son constituyentes del jugo de uva y son particularmente oxidables siendo la causa del ennegrecimiento del mosto blanco [50,51], en particular el ácido caftárico.

Las combinaciones del ácido cafeico con el ácido quínico se conocen desde hace bastante tiempo y se encuentran ampliamente difundidas en todo el reino vegetal. De estas combinaciones, el compuesto más conocido es el ácido clorogénico o 3-cafeato del ácido quínico (Fig. 9).

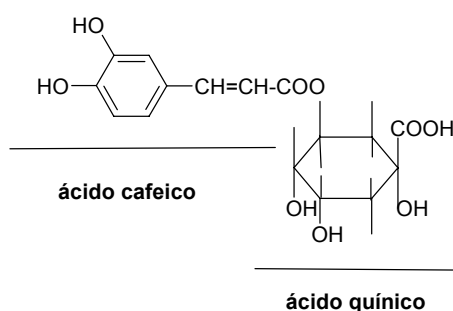


Fig. 9 Ácido clorogénico

La presencia de los ésteres tartáricos y la ausencia de ésteres quínicos (como el ácido clorogénico) son una de las especificidades del género *Vitis* si se compara con la mayor parte de las demás frutas. Sus contenidos varían en el hollejo de 0.06 a 0.78 mg/g para el ácido caftárico, de 0 a 0.3 mg/g para el ácido cutárico y menos de 0.06 mg/g para el ácido

fertárico. La concentración de los ésteres hidroxicinámicos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez enológica [52]. Además, el porcentaje de estos compuestos puede servir de criterio taxonómico [53].

2. **ESTILBENOS**

Se caracterizan por poseer dos ciclos bencénicos unidos generalmente por una cadena etanol o eventualmente etileno. Entre estos compuestos, el isómero trans del resveratrol o 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (Fig. 10) sería producido por la vid en respuesta a un ataque fúngico [54]. También se ha encontrado en la uva el derivado glucosilado del resveratrol [55].

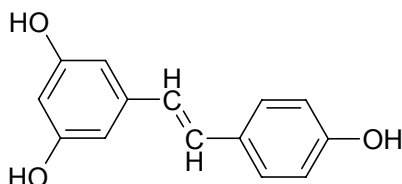


Fig. 10 Resveratrol

Las concentraciones de resveratrol encontradas oscilan para vinos tintos entre 0.001 y 10 mg/L, en vinos rosados entre 0.05 y 1.2 mg/L y en vinos blancos desde trazas a 0.190 mg/L.

1.3.1.2- FENOLES FLAVONOIDES

Todos ellos están caracterizados por un esqueleto base de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2-fenil-benzopirona (Fig. 11), es decir, están formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 carbonos, que se cierra en heterociclo oxigenado compuesto de 6 eslabones.

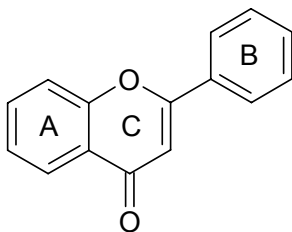


Fig. 11 2-fenil-benzopirona

Estos compuestos están divididos en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano. Entre ellos se encuentran los

polifenoles más interesantes de la composición de los vinos, por concentración y por propiedades específicas. Se clasifican en: antocianos, taninos y flavonoles.

1. ANTOCIANOS

Son pigmentos solubles en agua responsables de los colores anaranjados, rojos y púrpuras de flores, frutas y hojas [56-60]. Reciben su nombre del griego <<antos>> (flor) y <<kyanos>> (azul). En la uva están localizados en el hollejo, especialmente dentro de las vacuolas de las 3 ó 4 primeras capas celulares de la hipodermis, mientras la pulpa es incolora de forma que se pueden obtener mediante suave presión, vinos blancos de uvas tintas. Sólo la variedad de uvas *tintoreras* presenta la pulpa coloreada.

Su estructura comprende dos anillos bencénicos unidos por medio de un anillo heterocíclico y presentan, según el antociano de que se trate, variantes en algunos carbonos de los citados anillos bencénicos o del mencionado anillo heterocíclico. Este último anillo puede ser del tipo pirano o del tipo pirilio:

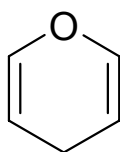


Fig. 12 Estructura pirano

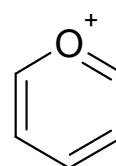


Fig. 13 Estructura pirilio

En dicho grupo pirilio se observa el oxígeno tetravalente con una valencia libre que confiere carácter iónico a la molécula entera del antociano. El grupo constituido por el primer anillo bencénico (A) ligado con el grupo pirilio recibe el nombre de grupo benzopirílico. Este grupo unido a su vez con el segundo anillo bencénico (B), se llama conjuntamente catión flavilio (Fig. 14).

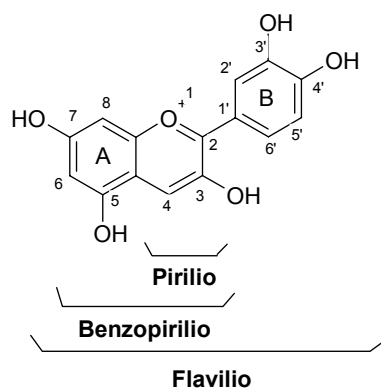


Fig. 14 *Catión flavilio*

Estos compuestos no existen en la naturaleza bajo forma antocianidina, pero sí bajo forma antocianina, dado que las antocianidinas están siempre esterificadas con una o más moléculas de un azúcar que les confiere estabilidad. Este complejo esterificado es el que toma el nombre de antocianina o antociano. Es decir, químicamente los antocianos son los glicósidos de las antocianidinas, y éstas son, por tanto, las agliconas de los antocianos.

Las agliconas (antocianidinas) de los antocianos presentan en varios carbonos grupos hidroxilo (OH) y a veces grupos metoxilo (OCH₃). En la Fig. 15 se muestra la estructura química de algunas antocianidinas conocidas.

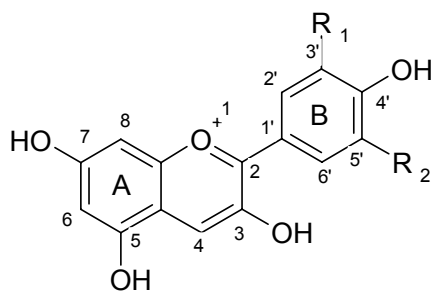


Fig. 15 *Fórmula estructural de las antocianidinas comunes*

Tabla 4. Antocianidinas más importantes en enología

Nombre	R ₁	R ₃
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Como se dijo anteriormente, en la naturaleza las antocianidinas se encuentran siempre como glicósidos. La glicosilación puede ocurrir en las posiciones 3, 5 y 7. El azúcar que participa con mayor frecuencia es la glucosa, aunque existen además, otros azúcares que participan en estos enlaces como ramnosa, galactosa y arabinosa. Según que la esterificación afecte a uno, dos o tres carbonos, los antocianos se llaman monoglicósidos, diglicósidos o triglicósidos. En la Fig. 16 puede observarse la estructura de las antocinidinas glicosiladas con una molécula de glucosa.

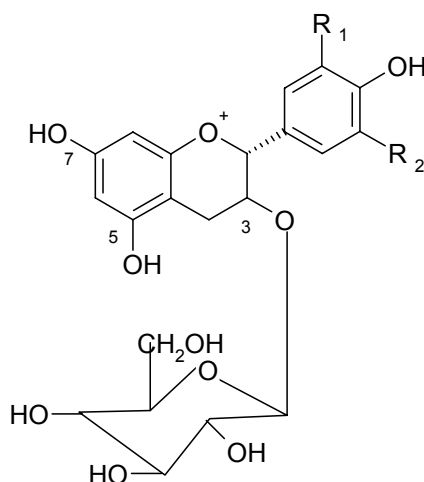


Fig. 16 Estructura de las antocianinas 3-monoglucosiladas

Los antocianos monoglucósidos están presentes en todas las especies conocidas del género *Vitis vinifera*, siendo ésta la especie de vid clásica en Europa. En Estados Unidos y en otros países no europeos se cultivan especies como *V. riparia* y *V. rupestris* y sus híbridos con la *V. vinifera*. Todas estas especies, pero no la *V. vinifera*, contienen tanto antocianos monoglucósidos como diglucósidos (Fig. 17) en cantidad importante [61]. Sin embargo, se han señalado trazas de antocianos

diglucósidos en ciertos frutos de *V. vinifera* [62], admitiéndose en los vinos derivados de estos últimos diglucósidos hasta 2 mg/L. De aquí se puede obtener una clave analítica para diferenciar vinos tintos obtenidos de variedades de *V. vinifera* de los vinos tintos obtenidos de variedades híbridas (la mayor parte proceden de *V. riparia* o de *V. rupestris*) y para identificar mezclas de vinos de las dos procedencias.

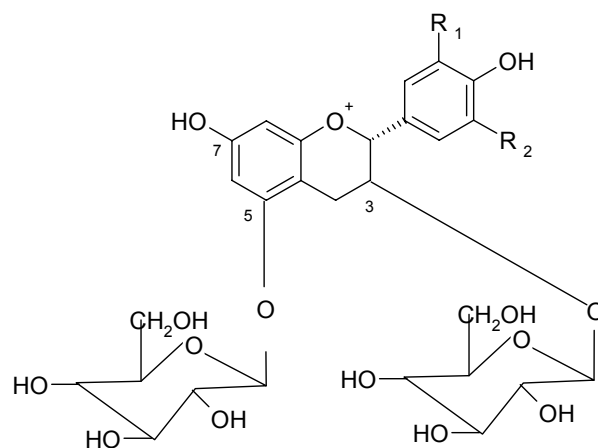


Fig. 17 Estructura de las antocianinas 3,5-diglucosiladas

Existe otra categoría de antocianos naturales que son los antocianos acilados y se caracterizan porque en ellos la misma molécula de azúcar que esterifica a la aglicona es a su vez esterificada por un ácido orgánico, frecuentemente fenólico, como el ácido p-cumárico y a veces el ácido cafeico o el ácido clorogénico.

Un ejemplo de una de estas moléculas es la que puede observarse en la figura siguiente:

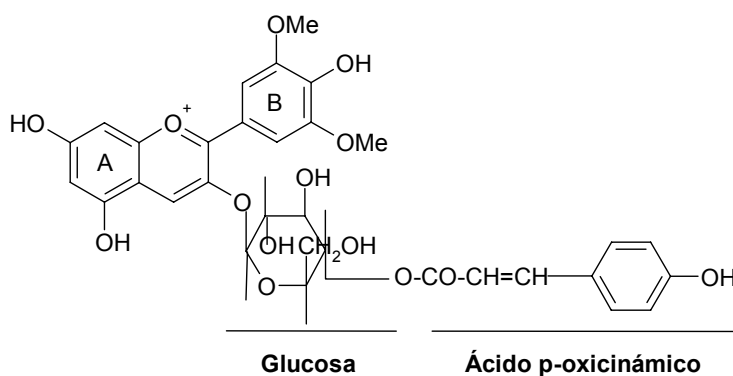


Fig. 18 Formación del p-cumarato-3-monoglucósido de malvidina

Si consideramos las seis antocianidinas de partida y tenemos en cuenta su esterificación con los posibles azúcares, que a su vez pueden estar acilados con varios ácidos, resulta evidente el elevado número de antocianos susceptibles de ser identificados en los vinos tintos.

Como puede observarse en la Fig. 19, las antocianinas existen en diferentes formas estructurales dependiendo del pH del medio. Cuando el pH del medio es bajo, la molécula de antociano presenta en el C1 un oxígeno con carga positiva, llamado *catión flavilio* (A^+) de color rojo vivo, y con una cierta decoloración, que es máxima a valores de pH de 3.2 a 3.5. A medida que el pH se eleva, las antocianinas se transforman en la *base quinona* (AO) de color azulado, variando desde el malva hasta el azul con valores de pH superiores a 4.0, e incluso llegando a tomar un color amarillo con pH superiores a 7.0, siendo todas estas reacciones reversibles.

Por otra parte, el nivel de oxidación del vino hace que las antocianinas permanezcan en forma de *catión flavilio* (A^+), cuando el potencial redox es elevado, pudiendo transformarse de manera reversible en la forma *base carbinol* (AOH) incolora, produciéndose una disminución del color del vino tinto en las condiciones de reducción. Este fenómeno se manifiesta en los vinos recién fermentados, donde su color se ve atenuado, apareciendo una mayor intensidad en la fase de crianza oxidativa. A partir de la base carbinol incolora (AOH) y por una reacción de tautomería, se pueden transformar las antocianinas en *calconas* (C) en sus formas cis y trans, de coloración amarilla, también de forma reversible, e inducidas por las temperaturas elevadas; razón por la cual en la crianza de los vinos conviene que la temperatura sea constante y reducida entre valores de 12° y 15°C. Cuando sobre las calconas se induce una oxidación, éstas pasan de manera irreversible hacia ácidos fenólicos incoloros, produciéndose entonces una destrucción del color.

Brouillard y col. [63, 64] han mostrado que esos colores son el reflejo de los equilibrios entre cuatro grupos de estructuras.

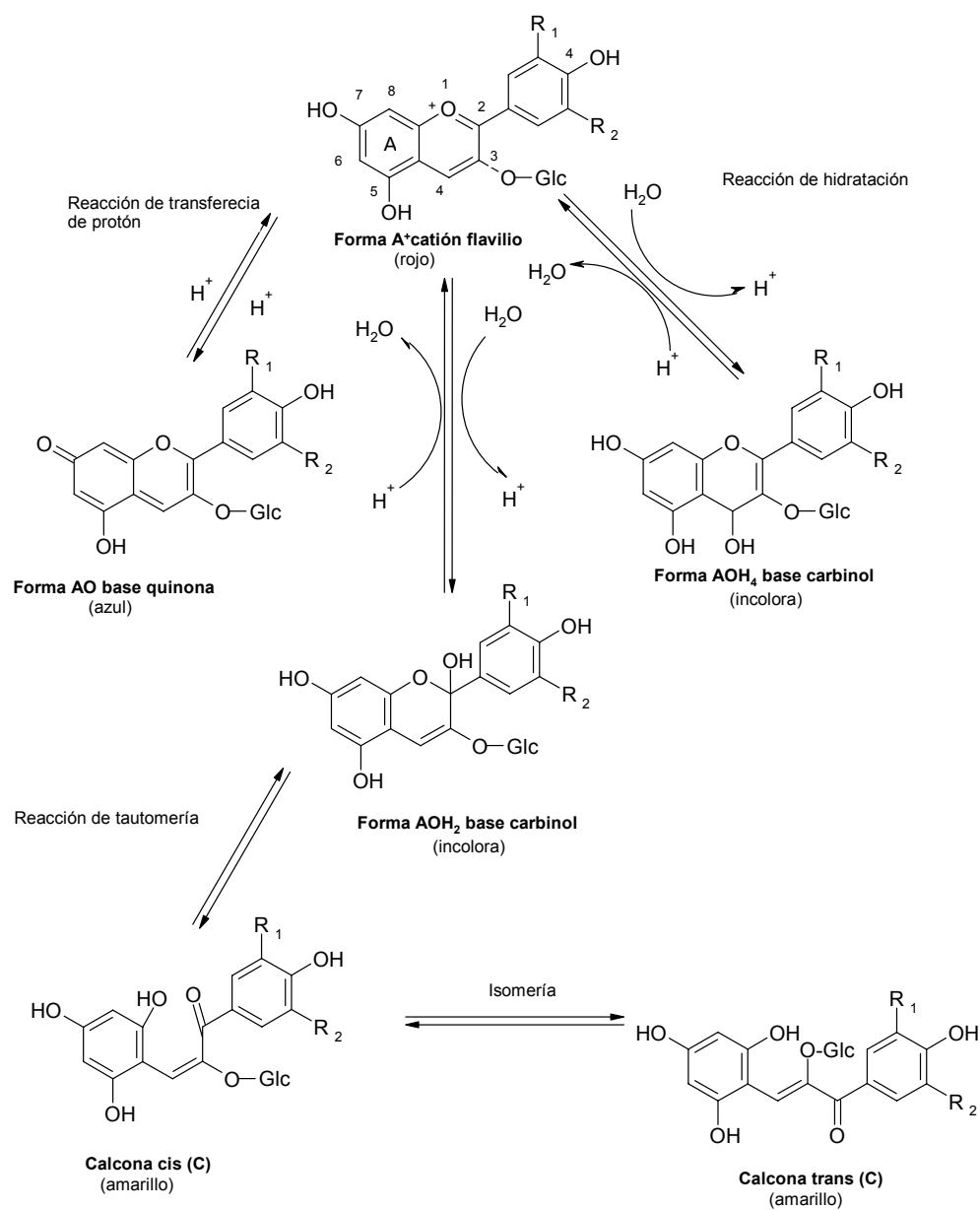


Fig. 19 Diferentes formas de las antocianinas

La importancia de las antocianinas se ve reflejada en sus propiedades ya que se utilizan como colorantes en comidas y bebidas cuyo pH esté por debajo de 4 [65].

La relación entre los diferentes antocianos presentes en un vino tinto varía con la variedad de uva. Además, la cantidad global de antocianos varía notablemente de un año a otro, pero representan siempre aproximadamente la mitad del contenido total fenólico presente en las células de la piel. A todo ello hay que añadir que los niveles relativos de antocianos pueden variar en función del terreno, de la temperatura y de las condiciones climáticas [66, 67].

2. **TANINOS**

El grupo de los taninos comprende compuestos fenólicos muy diferentes entre ellos, pero se caracterizan por ser sustancias capaces de dar combinaciones estables con las proteínas y con otros polímeros vegetales como los polisacáridos. Este modo de actuar afecta, además de a las proteínas de los vinos, a su carga enzimática dado que los taninos se combinan con el apoenzima pudiendo inhibir la actividad enzimática. Esta es una explicación parcial de la mayor resistencia frente a la oxidación presentada por los vinos tintos con respecto a los blancos, precisamente también por una parcial inhibición de las enzimas oxidantes desarrollada por los taninos en los cuales los vinos tintos son particularmente ricos.

Desde el punto de vista químico, son moléculas fenólicas relativamente voluminosas, pudiendo por tanto formar complejos estables con las proteínas al establecer un número suficiente de enlaces; pero si la molécula de tanino se hace demasiado grande corre el riesgo de no poder acercarse suficientemente a los sitios activos de las proteínas para reaccionar, resultando un enlace mucho menos sólido. Se puede decir que los enlaces más estables entre proteínas y taninos se obtienen para pesos moleculares de estos últimos comprendidos entre 600 y 3500.

Según la naturaleza de las moléculas elementales, se pueden clasificar en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables (o gálicos) y los taninos condensados. Los taninos contenidos naturalmente en la uva y en los vinos pertenecen sobre todo al segundo grupo, mientras que los utilizados como aditivos en el vino con fines tecnológicos o los presentes en el corcho de los tapones son del primer grupo.

- a) **TANINOS HIDROLIZABLES** (o gálicos): comprenden a los galotaninos y a los elagitaninos, liberando por hidrólisis ácida respectivamente ácido gálico (Fig. 20) y ácido elágico (Fig. 21), y ambos contienen una molécula de glucosa. Los más abundantes pertenecen a los elagitaninos, donde destacan la vescalagina (Fig. 24) y la castalagina

(Fig. 25), que al hidrolizarse se transforman respectivamente en vescalina (Fig. 22) y castalina (Fig. 23).

Estas sustancias son muy solubles en medios hidroalcohólicos como es el vino o los aguardientes [68]. Su oxidabilidad [69, 70] y sus propiedades gustativas [71] les confieren un sabor característico a los vinos tintos y blancos criados en barricas de roble.

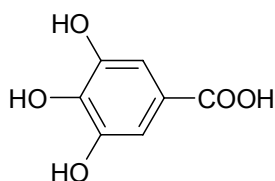


Fig. 20 Estructura del ácido gálico

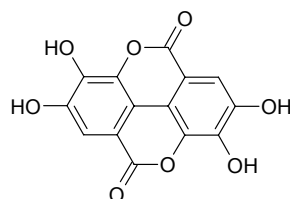


Fig. 21 Estructura del ácido elágico

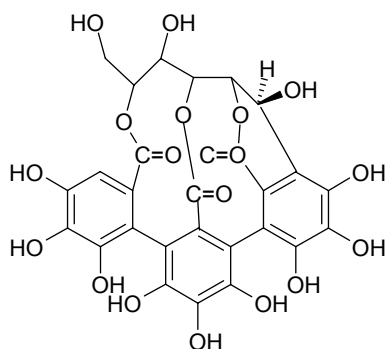


Fig. 22 Estructura de la vescalina

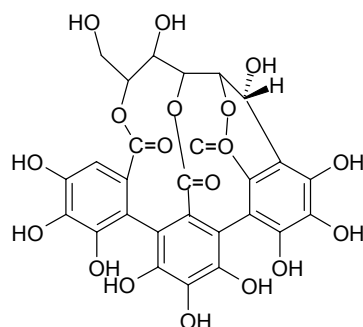


Fig. 23 Estructura de la castalina

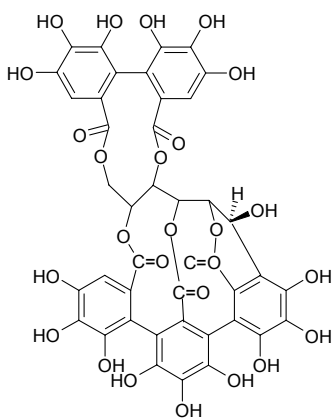


Fig. 24 Estructura de la vescalagina

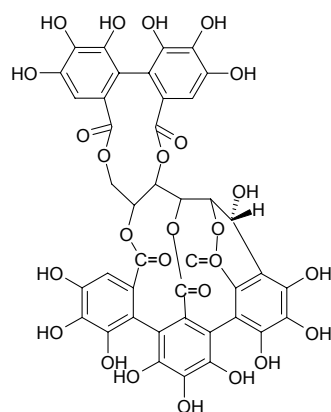


Fig. 25 Estructura de la castalagina

- b) **TANINOS CONDENSADOS**: son polímeros más o menos complejos de flavan-3-oles o 3-flavanoles, también llamados catequinas. Estas sustancias se localizan principalmente en las semillas, aunque se han detectado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa [72, 73].

Los principales 3-flavanoles monómeros de la uva cuya estructura puede observarse en la Fig. 26 son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina, pudiendo encontrarse este último bajo forma de éster gálico (3-galato de epicatequina). La galocatequina [74], el 3-galato de catequina y el 3-galato de galocatequina [75] han sido igualmente puestos de manifiesto, pero parecen específicos de ciertas variedades del género *Vitis*.

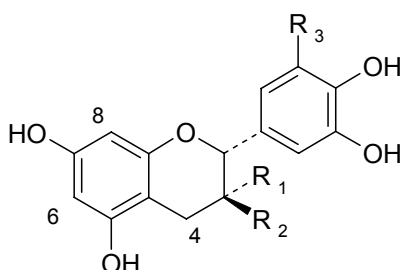


Fig. 26 Estructura de los flavanoles monómeros de la uva

Tabla 5. Catequinas más importantes en enología

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃
Catequina	H	OH	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epicatequina	OH	H	H
Epigalocatequina	OH	H	OH

Otros taninos más complejos derivados de los anteriores son las procianidinas dímeras, que se agrupan en dos categorías, designadas por una letra del alfabeto y por un número [76, 77]: procianidinas tipo A ($C_{30}H_{26}O_{12}$) y las procianidinas tipo B ($C_{30}H_{24}O_{12}$), siendo las primeras las más abundantes en la uva:

- Las procianidinas tipo A (Fig. 27) son dímeros que poseen además de la unión interflavano C4-C8 o C4-C6, un enlace éter entre los carbonos C5 o C7 de la unidad terminal y el carbono C2 de la unidad superior.

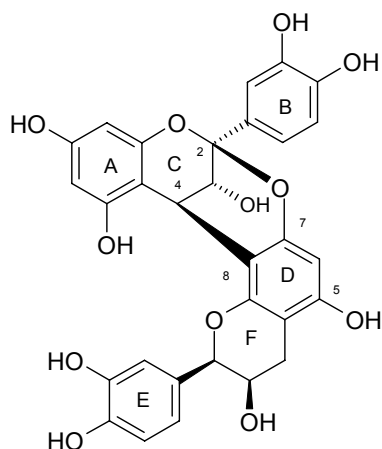


Fig. 27 Estructura de la procianidina dímera A_2 (Vivas y col. [70])

- Las procianidinas tipo B (Fig. 28) son dímeros resultantes de la condensación de dos unidades de flavan-3-oles unidas entre ellas por intermedio de un enlace C4-C8 (B1 a B4) o C4-C6 (B5 a B8). En la Tabla 6 se encuentran reflejadas algunas de las procianidinas tipo B.

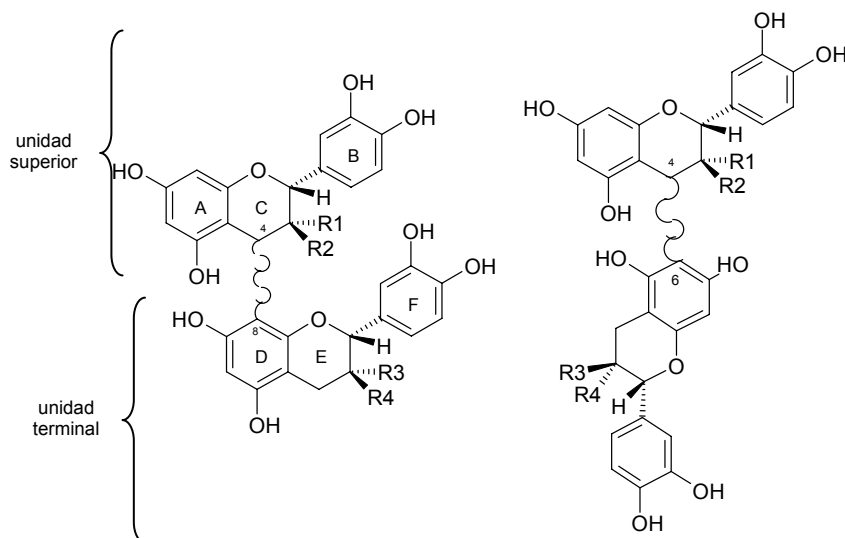


Fig. 28 Estructura de las procianidinas dímeros de tipo B (de Freitas [78])

Tabla 6. Procianidinas dímeros tipo B

Nombre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B1: 2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3R,4R,2''R,3''S]epicatequina-(4β→8)-catequina	OH	H	H	OH
B2: 2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→8)-epicatequina	OH	H	OH	H
B3: 2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3S,4S,2''R,3''S]epicatequina-(4β→8)-catequina	H	OH	H	OH
B4: 2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3S,4S,2''R,3''R]catequina-(4α→8)-epicatequina	H	OH	OH	H
B5: 2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→6)-epicatequina	OH	H	OH	H
B6: 2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3S,4S,2''R,3''S]catequina-(4α→6)-catequina	H	OH	H	OH
B7: 2,3-cis-3,4-trans-2'',3''- trans[2R,3R,4R,2''R,3''R]epicatequina-(4β→6)-catequina	OH	H	H	OH
B8: 2,3-trans-3,4-trans-2'',3''- cis[2R,3S,4S,2''R,3''R]catequina-(4α→6)-epicatequina	H	OH	OH	H

Existen también procianidinas trímeras que se clasifican en dos categorías:

- Las procianidinas de tipo C son trímeros cuyas dos uniones interflavanas corresponden al tipo B de los dímeros.
- Las procianidinas de tipo D son trímeros en los cuales un enlace interflavano es de tipo B y el otro de tipo A.

Las procianidinas oligómeros (Fig. 29) son polímeros mucho más complejos, formados por 3 a 10 unidades de flavanoles relacionadas por uniones C4-C8 ó C4-C6, así como las procianidinas condensadas, formadas por más de 10 unidades flavanoles, alcanzando un peso molecular superior a 3000.

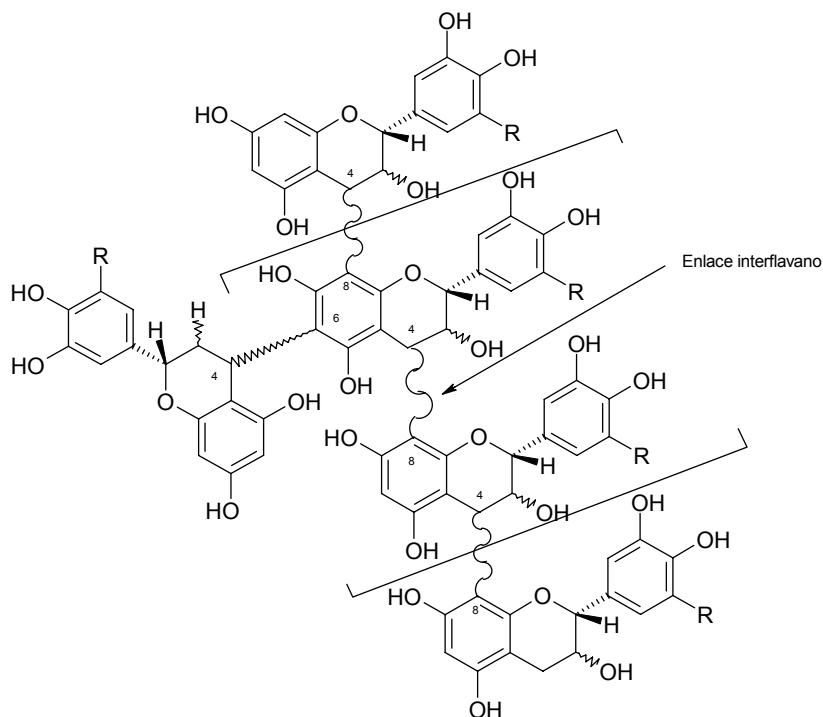


Fig. 29 Estructura de las procianidinas condensadas

Estas moléculas en medio ácido y caliente presentan la propiedad de liberar carbocationes, fuertemente inestables, por ruptura de las uniones intermonoméricas [79] transformándose en productos de condensación pardos y sobre todo en cianidina roja, de ahí el nombre de “procianidina” (proantocianidina o proantocianidol). Antiguamente estas sustancias eran conocidas erróneamente como leucoantocianos o leucocianidoles.

En las pepitas los taninos se encuentran menos condensados, con un grado de polimerización cercano a 10, mientras que los hollejos son más complejos y con un grado de polimerización cercano a 30 [80, 81], encontrándose casi siempre una mayor cantidad de taninos en las pepitas. Los taninos de los hollejos se diferencian de los de las pepitas por la presencia de epigallocatequina, por tener un mayor grado de polimerización y por poseer una menor proporción de unidades de ácido gálico.

En los vinos el contenido en taninos es muy variable, en el vino tinto depende del cepaje y de las condiciones de vinificación, oscilando de 1 a 4 g/L. En el caso del vino blanco va desde 0.1 a 0.3 g/L.

3. FLAVONOLES

Están únicamente presentes en los hollejos, bajo forma de glucósidos en posición 3 [44, 82, 83].

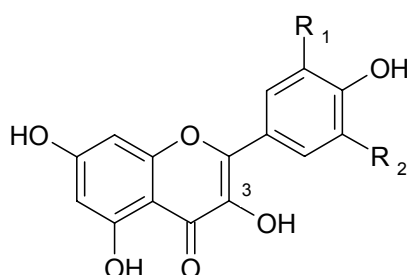


Fig. 30 Estructura de los flavonoles de mayor importancia enológica

Tabla 7. Flavonoles más importantes en enología

Nombre	R ₁	R ₂
Kempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH

Son pigmentos de color amarillo que se encuentran tanto en los vinos blancos como en los tintos. Las cantidades de flavonoles en los vinos blancos son tan pequeñas que no influyen en el color. Por el contrario, en los vinos tintos la proporción de flavonoles es notablemente más alta (hasta unos 15-20 mg/L).

Las agliconas de los flavonoles están presentes en los vinos tintos después de algunos meses de la vinificación, mientras que en la uva están presentes sus glicósidos, los cuales después se hidrolizan en el vino. En la uva se han caracterizado ocho flavonoles monoglicósidos y tres diglicósidos. Las formas glucosiladas son las más abundantes, pero también se encuentran galactosa, xilosa y arabinosa (sobre todo en los diglicósidos).

1.3.2- CONTENIDO POLIFENOLICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La composición del vino es compleja. La comparación de la composición fenólica de la uva y del vino muestra que junto a las moléculas directamente

procedentes de la baya, aparecen en el vino otros fenoles. Estos constituyentes específicos del vino comprenden en particular los compuestos procedentes de las etapas fermentativas, pero también comprenden numerosos productos resultantes de la evolución de los polifenoles nativos de la baya de uva.

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas. Su concentración es baja en la pulpa. La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo [2, 84, 85], aunque el envejecimiento en madera también aporta pequeñas cantidades de polifenoles al producto final [26].

El color del vino tinto se debe a la presencia de las antocianinas, en forma libre y combinadas a las procianidinas, que contribuyen a los componentes rojo, amarillo y azul del color del vino, en función del pH del medio [63, 86, 87] y también a las procianidinas y flavonoles que contribuyen al componente amarillo [88]. Durante el almacenamiento y envejecimiento de los vinos tintos tienen lugar cambios progresivos de los compuestos polifenólicos extraídos inicialmente de las uvas. En sistemas de disoluciones modelo, se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de estos fenómenos complejos así como de los mecanismos implicados en esas transformaciones y de las estructuras químicas de los compuestos resultantes [89-98]. Los cambios producidos en el color de los vinos tintos en estas etapas, se atribuyen a la formación progresiva de pigmentos condensados resultantes de la interacción entre antocianinas y otros compuestos fenólicos, especialmente flavanoles tales como catequinas y procianidinas (taninos condensados). En la formación de esos nuevos pigmentos se ha sugerido que intervienen diferentes mecanismos: fenómenos de copigmentación [99-103], condensación directa entre antocianinas y flavanoles [89, 104-107] y reacciones entre ellos mediadas por acetaldehído [90, 108-115].

La polimerización de las procianidinas da lugar a una disminución del gusto amargo [116, 117] y de la astringencia, y también a un incremento del componente amarillo del color [118].

Fenoles totales

Hay varios métodos para estimar el contenido de fenoles totales en vinos: precipitación con metales pesados, precipitación por adición de compuestos orgánicos, oxidación bajo condiciones controladas y formación de productos coloreados con varios elementos químicos.

Sólo dos métodos sobrevivieron: el método de Neubaer-Löwenthal [119] y el método de Folin-Denis [120]. El primero fue inicialmente el método oficial de la

AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), pero fue reemplazado por el método de Folin-Denis. Más recientemente el reactivo de Folin-Denis fue reemplazado por el reactivo de Folin-Ciocalteu.

El estándar que se usa de comparación en el método de Folin-Ciocalteu es el ácido gálico, que es un estándar satisfactorio dado que se obtiene puro fácilmente además de ofrecer una solubilidad satisfactoria, una adecuada estabilidad y un bajo precio. La respuesta obtenida con ácido gálico es equivalente a la mostrada con la mayoría de los otros compuestos polifenólicos en el vino y además, no se han revelado anomalías o problemas con su uso, por tanto parece ser el estándar de referencia preferible para el ensayo de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu [121].

La concentración total de compuestos polifenólicos en el vino varía entre 1.80 y 4.06 g/L equivalentes en ácido gálico, con un promedio de 2.57 g/L para vino tinto, y de 0.16 a 0.33 g/L, con un promedio de 0.24 g/L, para el vino blanco [122].

Actividad antioxidante

Las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud. La evidencia actual demuestra que patologías crónicas como arterioesclerosis y cáncer, están asociadas a daño oxidativo [123]. Lo mismo ocurre con las complicaciones de otras condiciones patológicas como artritis, diabetes, nefropatías y demencias [124].

Aproximadamente un 2% del oxígeno consumido por un organismo normal va a la formación de especies reactivas de este elemento (EROs: especies reactivas de oxígeno) de las cuales algunas son radicales libres [125]. Se denomina **estrés oxidativo** al daño producido por lesión química de las estructuras biológicas cuando la generación de EROs sobrepasa las barreras de defensa antioxidantes del organismo. Por tanto, estas defensas son claves para la prevención de estas enfermedades.

Los polifenoles son, en su mayoría, potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales de frutas y verduras, y se encuentran también en bebidas como el té y el vino [126].

El vino tinto es una fuente excelente de polifenoles de distintos tipos y puede contener entre 1000 y 4000 mg/L de varias clases de ellos [127]. Los vinos tintos tienen una alta capacidad antioxidante y esta propiedad está correlacionada con su contenido en flavanoles [128, 129], antocianinas [130, 131], y ácido tánico [132], aunque se cree que las propiedades antioxidantes del vino tinto están relacionadas con la concentración de polifenoles totales [122, 133] más que con la concentración de cada compuesto individual. Debido a que estas propiedades

antioxidantes se deben a los compuestos polifenólicos, a mayor concentración mayor es dicha actividad antioxidante. En estudios *in vitro*, se ha observado que muchos polifenoles naturales son mejores antioxidantes que las vitaminas E y C [134]. Además inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres ya que pueden quelar metales, especialmente hierro y cobre [135].

Dicha capacidad se debe a la acción conjunta de antioxidantes de muy variada reactividad y que aproximadamente un 80% de ellos son solubles en agua (hidrofílicos). Esto indica que cada componente polifenólico contribuye en forma diferente a la capacidad antioxidante del vino. Cada polifenol tiene una cierta actividad antioxidante, la que se mide en compuestos puros. Sin embargo, en una mezcla como vino, la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también está determinada por la interacción entre ellos, dado que se pueden producir efectos sinérgicos o inhibitorios.

Los métodos que han sido desarrollados para la medida de la actividad antioxidante son esencialmente métodos de inhibición: se genera una especie radical libre, cuya evolución se liga a un punto final que puede observarse y cuantificarse. La adición de un antioxidante inhibe este desarrollo y la respuesta observada se cuantifica [136].

Los métodos varían mucho según el radical que se genera, la reproducibilidad del proceso de generación y el punto final que se usa. Entre ellos se puede mencionar el ensayo TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) desarrollado por Wayner [137], el uso del radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (test del DPPH) [138], el método de la metilmioglobina/ABTS desarrollado por Rice-Evans y Miller [136], la reacción de peroxidación del linoleato (test LH/LUV) [139] y otros [140-143].

Separación e identificación de polifenoles

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química necesarios para el funcionamiento de las células vegetales que se encuentran en frutas y verduras, y en bebidas como té y vino.

El interés por estudiar el vino nació después de una investigación de la Organización Mundial de la Salud: el proyecto MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) en 1989 [144]. Se comprobó que Francia presentaba unas cifras de mortalidad por cardiopatía coronaria muy bajas,

comparado con Estados Unidos o Gran Bretaña, a pesar de tener un consumo muy elevado de grasas saturadas y unas cifras de colesterol sérico también muy alto. A este fenómeno se le conoce como la “paradoja francesa”. Posteriormente Renaud y de Lorgeril analizaron estos resultados y comprobaron que cuando introducían el consumo de vino en el análisis, se anulaba el efecto negativo de las grasas saturadas sobre la mortalidad coronaria, de modo que concluyeron que la “paradoja francesa” se debía al elevado consumo de vino en este país [26].

Tradicionalmente para la determinación de estos compuestos en vinos, se utilizaron distintos tipos de métodos espectrofotométricos, alguno de los cuales estaban basados en el aumento de intensidad de color sufrido por disoluciones de ellos cuando el pH cae bruscamente [145], sobre todo en el caso de las antocianinas. También para estas últimas se utilizaron métodos basados en la pérdida de color que sufren estos compuestos por la presencia de SO₂ [146] o de H₂O₂ [147]. Otros métodos más sensibles y reproducibles se basan en la decoloración con bisulfito [87].

Un método extensamente usado para la separación de estos compuestos es la cromatografía en papel y la cromatografía en capa fina, pero en estos dos métodos la cuantificación es difícil además de requerir bastante tiempo. Por lo tanto han sido reemplazados por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Bakker y col.* [148] descubrieron que HPLC es uno de los mejores métodos para la identificación de estos compuestos en vino.

Después de los trabajos de *Williams y col.* [149] y *Wulf y Nagel* [150], H.P.L.C. en fase reversa se convirtió en la técnica estándar que permite la completa separación de una forma rápida de estos compuestos. Sin embargo, para poder identificarlos son necesarios aislamientos previos. El empleo del detector Array de Diodos (DAD) junto con H.P.L.C. permite la rápida y simultánea separación, identificación y cuantificación de los distintos compuestos fenólicos según sus propiedades espectrales y su orden de elución sin necesidad de aislamientos previos. Se trata de una herramienta analítica que permite la separación y cuantificación de la inmensa mayoría de estas especies y por tanto observar su evolución en las diferentes etapas de elaboración de los vinos.

DAD registra simultáneamente análisis cromatográficos a distintas longitudes de onda (λ); ésto permite por una parte la cuantificación de cada antocianina para una λ de absorción máxima y por otra, la identificación de alguno de esos compuestos mucho más rápidamente por registro de los cromatogramas y la λ característica de cada uno.

Debido a que la estructura de todos los compuestos estudiados (sobre todo la de las antocianinas) es muy similar y sólo se diferencian en alguno de los

sustituyentes en el anillo aromático, y por lo tanto en el peso molecular, es necesario disponer de alguna herramienta analítica que permita obtener información adicional ya que con los tiempos de retención y las propiedades espectrales de los compuestos no es suficiente para llevar a cabo la identificación de los mismos.

En los últimos años se ha empezado a utilizar la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a la Espectrometría de Masas (HPLC/MS), convirtiéndose en una poderosa técnica que no sólo permite confirmar la identificación de los compuestos, sino que también proporciona información acerca de ellos como puede ser la naturaleza de los sustituyentes y la localización de los mismos en el anillo de la molécula.

Parece pues evidente, que se dispone de una herramienta analítica que permite la separación y cuantificación de la inmensa mayoría de estas especies y por tanto observar su evolución en las diferentes etapas de la elaboración de los vinos o, durante el transcurso de experiencias enológicas. Estos resultados pueden ser interpretados de una manera mucho más fiable y con ello, las conclusiones son de mucha mayor utilidad.

Otra de las facetas del análisis de estos compuestos es la caracterización y diferenciación o clasificación de vinos. El análisis de estos compuestos puede proporcionar una “huella dactilar” de cada vino de forma que permita su diferenciación del resto ya que su contenido en el vino depende tanto de la variedad vinífera y el rendimiento de la cosecha como de las condiciones edafoclimáticas y técnicas culturales aplicadas al viñedo [84, 85]. Entre ellos, se ha propuesto utilizar a las antocianinas como marcadores químicos para diferenciar uvas procedentes de distintos cultivos y vinos hechos con diferentes tipos de uvas [151-156]. Sin embargo, esta herramienta tiene que ser utilizada con cuidado ya que en muchas especies de *Vitis vinífera* se han identificado muchos clones y algunos datos sugieren que la composición antocianínica de algunos de esos clones pertenecientes al mismo cultivo pueden ser significativamente diferentes [157].

Además actualmente se conoce el papel esencial de estos compuestos en la calidad de los vinos finales, que se acentúa o se hace más clara en el caso de los vinos tintos. Son los responsables del color, astringencia y estructura de los vinos, y en particular los taninos y los antocianos. Pero a su vez, y dependiendo del tipo de tanino, pueden degradar la calidad debido a la astringencia y gusto a verde que pueden comunicar, por lo que tiene gran incidencia en sus características organolépticas, características que definen la calidad de los vinos.

2. OBJETIVOS

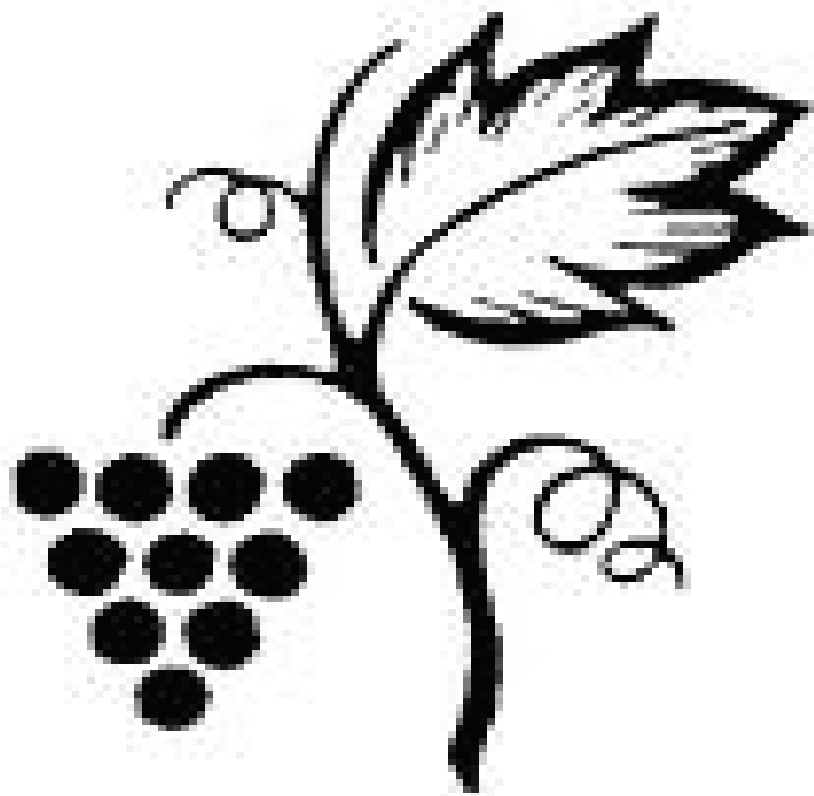


2.1- OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto en la sección anterior, en el presente trabajo se tratarán de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de la metodología analítica adecuada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos mediante HPLC y HPLC/MS, con sistema de detección Array de Diodos en ambos casos.
2. Estudio del contenido polifenólico de vinos tintos de las D.O. Ribeira Sacra, Ribeiro y Valdeorras en base a los siguientes parámetros:
 - Contenido de fenoles totales.
 - Niveles de polifenoles no flavonoides y flavonoides, fundamentalmente antocianinas.
3. Estudio de la actividad antioxidante de estos vinos, en función de su contenido polifenólico.

3. PARTE EXPERIMENTAL



3.1- PATRONES Y OTROS REACTIVOS UTILIZADOS

3.1.1- HPLC Y HPLC/MS

A) Patrones

Ácidos Benzoicos

GálicoEXTRASYNTHESE

Ácido 4-hidroxibenzoico (p-hidroxibenzoico) ALDRICH

Catequinas

Epicatequina..... FLUKA

Ácidos Cinámicos

Ácido 4-hidroxicinámico (p-cumárico).....FLUKA

Ácido 3,4-dihidroxicinámico (cafeico)... FLUKA

Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ferúlico).....FLUKA

Antocianinas

Cloruro de delphinidina..... EXTRASYNTHESE

Cloruro de cianidina..... EXTRASYNTHESE

Cloruro de pelargonidina..... EXTRASYNTHESE

Cloruro de peonidina..... EXTRASYNTHESE

Cloruro de malvidina..... EXTRASYNTHESE

Ácidos fenólicos

4-hidroxibenzaldeido..... EXTRASYNTHESE

Flavonoles

KempferolFLUKA

MiricetinaFLUKA

B) Disolventes

- Acetonitrilo para H.P.L.C.PANREAC
- Ácido Fórmico..... FLUKA
- Metanol para H.P.L.C.....PANREAC
- Ácido Clorhídrico 35%PANREAC
- Agua ultrapura Milli-Q.....MILLIPORE

3.1.2- FENOLES TOTALES

- Tungstato sódicoPANREAC
- Molibdato sódico.....PANREAC
- Acido fosfóricoPANREAC
- Acido clorhídrico concentrado.....PANREAC
- Sulfato de litio monohidratado.....PANREAC
- Bromo.....PANREAC
- Carbonato sódico anhidro.....PANREAC
- Acido gálicoEXTRASYNTHESE
- Agua ultrapura Milli-Q.....MILLIPORE
- Etanol 96 %PANREAC

3.1.3- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

- 2,2'-Azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)
.....SIGMA
- Persulfato potásicoPANREAC
- Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox)
.....ALDRICH
- Etanol 96 %PANREAC
- Agua ultrapura Milli-Q.....MILLIPORE

3.2- PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

3.2.1- HPLC Y HPLC/MS

Disoluciones individuales de compuestos polifenólicos

Debido a que uno de los objetivos de este estudio es la identificación de compuestos polifenólicos en vinos, se prepararon disoluciones patrón de cada uno de ellos como se indica a continuación:

- *Gálico, p-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzaldehído, p-cumárico, epicatequina, ácido ferúlico y cafeico* se disolvieron en una mezcla de metanol/agua (1:1).
- *Kempferol y miricetina* se disolvieron en metanol puro.
- *Cloruros de delfinidina, cianidina, pelargonidina, peonidina y malvidina* se prepararon por disolución en metanol acidificado con HCl (0.1%)

Cada una de estas disoluciones fue filtrada a través de filtros de nylon de 0.45µm y posteriormente fueron guardadas en viales de vidrio de color topacio en el congelador a – 20°C, de donde se extraían las cantidades necesarias cada vez que se realizaba la inyección de las mismas en el sistema cromatográfico. Para evitar que tuviesen lugar reacciones fotoquímicas durante el manejo de las disoluciones, éstas fueron recubiertas con papel de aluminio, a la vez que se reducía al máximo el tiempo de permanencia de las mismas fuera del congelador, para minimizar el riesgo de posibles transformaciones de los compuestos provocadas por el cambio de temperatura.

Disoluciones stock de compuestos polifenólicos

Con el objetivo de determinar el tiempo de retención de cada compuesto en una mezcla, la elección del mejor gradiente, el estudio de la repetibilidad de método, rango de linealidad y límites de detección y cuantificación, se prepararon *disoluciones madre* que contenían todos los compuestos polifenólicos a determinar en una concentración de 25 ppm cada uno. Las disoluciones madre se prepararon tomando la cantidad necesaria de cada una de las disoluciones individuales y diluyendo en metanol acidificado con HCl al 0.1%.

Preparación de las fases móviles

A) HPLC

Para la separación de los distintos patrones se han probado gradientes con dos disolventes:

- **Disolvente A:** Ácido Fórmico al 4.5% en agua Milli-Q. Se filtró con un equipo de filtración de muestras Millipore, tamaño de poro 0.22 μm , tipo GS.
- **Disolvente B:** Acetonitrilo

Ambos disolventes se desgasificaron mediante un baño de ultrasonidos durante 20 minutos previamente a su utilización.

B) HPLC/MS

Aquí también la separación de los distintos patrones se llevó a cabo con dos disolventes:

- **Disolvente A :** Ácido Fórmico al 3% en agua Milli-Q. Se filtró con un equipo de filtración de muestras Millipore, tamaño de poro 0.22 μm , tipo GS.
- **Disolvente B :** se utilizó una mezcla compuesta por ácido Fórmico/Acetonitrilo/Metanol/ agua Milli-Q (3:38:38:21). También esta disolución se filtró con un equipo de filtración de muestras Millipore, tamaño de poro 0.22 μm , tipo GS.

3.2.2- FENOLES TOTALES

Disoluciones para la gráfica de calibración

Para poder calcular el contenido en fenoles totales de las muestras se utilizó el método Singleton [121]. Fue necesario construir una recta de calibrado y para ello se prepararon distintas disoluciones del patrón de ácido gálico a diferentes niveles de concentración (de 0 a 500 mg/L).

A cada una de estas disoluciones se añadió el reactivo de Folin-Ciocalteu y una disolución de carbonato sódico, y se midió la absorbancia a 765 nm.

La disolución de carbonato sódico se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 200 g de carbonato sódico anhidro en 1 L de agua en ebullición, se dejó

enfriar a temperatura ambiente y se sembró con unos pocos cristales de carbonato sódico. Pasadas 24 horas se filtró la disolución.

3.2.3- ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Disoluciones patrón

Para poder calcular la actividad antioxidante de nuestros vinos se siguió una modificación del método descrito por Rice-Evans y col. [136] y para ello se procedió del modo siguiente: se preparó una disolución acuosa de ABTS 7 mM, que se hizo reaccionar con una disolución de persulfato potásico 2.45 mM. Como reaccionan estequiométricamente 1:0.5, se mezclaron 10 mL de ABTS y 20 mL de persulfato, para dar lugar al catión radical ABTS^+ . Después de mezclar los dos reactivos se dejaron entre 12 y 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para que se produjese la reacción completa. Esta disolución es estable durante 2 días si se mantiene en estas mismas condiciones.

Tras obtener el ABTS^+ , se diluye con etanol al 96% hasta obtener una absorbancia de 0.70 (± 0.02), a una λ de 734 nm.

Tras esto se prepara una disolución de Trolox (6.00 mM) disolviéndola en etanol del 96%.

3.3- EQUIPO Y MATERIAL UTILIZADO

A continuación se citan los aparatos y el material utilizado para el desarrollo de este trabajo.

3.3.1- HPLC Y HPLC/MS

A) Preparación de las disoluciones:

- Balanza de precisión PRECISA, serie 300^a.
- Micropipetas ACCUPIPET y SOCOREX.
- Equipo de purificación de agua Milli-Q (MILLIPORE).
- Filtros NYLION-ACRODISC de 0.45 μm de tamaño de poro (GELMAN-SUECES).
- Jeringuillas desechables de 1mL PLASTIPAK.
- Material de vidrio diverso.

B) Preparación de las muestras de vino:

- Micropipetas ACCUIPET y SOCOREX.
- Centrífuga CENTROMIX P SELECTA.
- Filtros NYLON-ACRODISC de 0.45 μm de tamaño de poro (GELMAN SUECES).
- Jeringuillas desechables de 1mL PLASTIPAK.
- Material de vidrio diverso.

C) Cromatografía líquida de alta resolución:

Para el desarrollo de este trabajo, el equipo cromatográfico empleado consta de los siguientes elementos:

- 2 bombas Waters, modelo 501.
- Programador de gradientes Waters, modelo 680.
- Inyector RHEODYNE 7010.
- Columnas cromatográficas:
 - Columna Waters modelo SPHERISORB ODS2 S5, de 150 x 4,6 mm y de tamaño de partícula 5 μm .
 - Columna Hypersil modelo HYPERSIL ODS, de 150 x 4,6 mm y de tamaño de partícula 5 μm .
 - Columna Waters modelo NOVA-PAK C18, de 150 x 3,9 mm y de tamaño de partícula 4 μm .
- Detector Array de Diodos Waters 990 que realiza barridos en el rango de longitudes de onda: 190-800 nm.
- Ordenador DIGITAL Venturis.
- Impresora HP 660C.
- Programa Millenium Express, versión 2.15.

D) HPLC/MS:

El equipo HPLC/ES/MS utilizado consta de las siguientes partes:

- Espectrómetro de masas modelo MSD 1100 que consta de 2 fuentes de impacto electrónico: APCI y ES (en modo positivo y negativo).
- Desgasificador en línea HP 1100.
- Sistema de bombeo binario HP 1100.
- Inyector automático HP 1100.
- Columna NOVA-PAK C18, de 150 x 3,9 mm.
- Termostatizador de columna HP 1100.

- Detector Array de Diodos HP 1100 que realiza barridos en el rango de longitudes de onda: 191-949 nm.
- Analizador de masas cuadrupolo.
- Ordenador HP Vectra XA, Pentium MMX.
- Impresora HP LaserJet 6L.
- Programa HPLC/MSD ChemStation.

Advertencias generales

- La limpieza de la columna SPHERISORB ODS2 S5, de 150 x 4,6 mm se realizó haciendo pasar disolución de Metanol al 60% en agua Milli-Q, a 1mL/min durante 20 min.
- La limpieza de la columna HYPERSIL ODS, de 150 x 4,6 mm se realizó haciendo pasar disolución de Acetonitrilo al 60% en agua Milli-Q, a 1mL/min durante 20 min.
- La limpieza de la columna NOVA-PAK C₁₈, de 150 x 3,9 mm se realizó haciendo pasar Metanol, a 1mL/min durante 20 min.
- Para evitar posibles degradaciones de los compuestos polifenólicos en disolución a temperatura ambiente, los patrones y las muestras se conservaron en el congelador a una temperatura de -20°C.
- Las muestras de vino, una vez preparadas, se inyectaron inmediatamente en el cromatógrafo y una vez utilizadas se conservaron en el congelador para posteriores análisis.

3.3.2- FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

- Balanza de precisión PRECISA, serie 300^a.
- Micropipeta SOCOREX.
- Cubetas de vidrio de 10 mm de paso de luz.
- Espectrofotómetro Helios γ
- Material de vidrio diverso.

4. SEPARACIÓN DE POLIFENÓLES



El análisis de los compuestos polifenólicos es un problema verdaderamente complicado debido a la enorme complejidad de esta familia de compuestos. En la actualidad aún no se ha resuelto completamente y su estudio es objeto de investigación. Una de las principales razones que dificulta considerablemente su análisis e identificación es la no disponibilidad de patrones comerciales que permitan la identificación de los diferentes compuestos polifenólicos. Las tendencias actuales en el análisis de estos compuestos se basan en técnicas de HPLC, asociadas a un espectrómetro de masas, lo que permite la identificación de las moléculas analizadas.

En el presente trabajo se ha puesto a punto la metodología analítica adecuada para la separación, identificación y cuantificación de estos compuestos mediante HPLC y HPLC/MS.

4.1- HPLC

En este trabajo se hace un estudio de la separación de distintos compuestos polifenólicos basado en el procedimiento descrito por E. Hebrero y col. [158], en el que identificaban antocianinas de *Vitis Vinífera* por HPLC-DAS. Para esto se hacen pruebas de diferentes gradientes con tres columnas distintas:

- SPHERISORB ODS2 S5, de 150 x 4,6 mm, de tamaño de partícula 5 µm.
- HYPERSIL ODS, de 150 x 4,6 mm, de tamaño de partícula 5 µm.
- NOVA-PAK C18, de 150 x 3,9 mm, de tamaño de partícula 4 µm.

Dado que la técnica cromatográfica empleada en este trabajo es HPLC en fase reversa, se eligió como empaquetado de la fase estacionaria C18 u ODS (octadecilsilano), que se obtiene por derivatización de una superficie de sílice con un reactivo silano-alifático de cadena larga alifática de 18 átomos de carbono (químicamente reacciona por un sitio silanol). Esta es una de las fases estacionarias más utilizadas en este tipo de cromatografía, ya que las interacciones responsables de la retención se ven favorecidas por disolventes de tipo acuoso y acuoso-orgánicos (polares).

En cuanto al *diámetro medio de las partículas*, cuanto menor sea éste, mayor será la densidad particular dentro de la columna, por lo que las fuerzas entre el soluto y la fase estacionaria son más probables, traducándose en una mayor eficiencia, en un mayor número de platos teóricos y en una disminución de su altura. El tamaño de partícula más utilizado actualmente es de 5 µm, aunque ya se usan partículas de tan sólo 3 µm que permiten una mayor eficiencia, pero tienen como

desventaja un tiempo de vida mucho más corto de la columna. Por ello se eligió para dos de las columnas probadas tamaños de partícula de 5 μm y para la tercera de 4 μm .

El *tamaño de poro* determina la capacidad de retención de los compuestos en la columna. En los poros se establece el equilibrio de distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. El tamaño de poro debe ir en función de las moléculas que se quieran analizar, así cuanto mayor sea el peso molecular del analito el tamaño de poro también debe ser mayor. Para analitos de peso molecular menor de 3000 el tamaño de poro debe estar entre 60 Å y 130 Å. Para las tres columnas escogidas el tamaño de poro varía de 60 a 120 Å.

La *carga de carbón* depende de la densidad de ligando que esté sobre la sílice. A mayor densidad de ligando mayor porcentaje de carbón es necesaria para disminuir el tamaño de poro. En las columnas elegidas la carga de carbón va desde el 7% hasta el 11.5%.

Se probaron además de diferentes columnas cromatográficas, diferentes gradientes de elución. Como se indicó anteriormente, el escoger una composición de fase móvil junto con la curva de gradiente adecuada, permite mejorar sensiblemente una separación cromatográfica.

Elución en régimen de gradiente

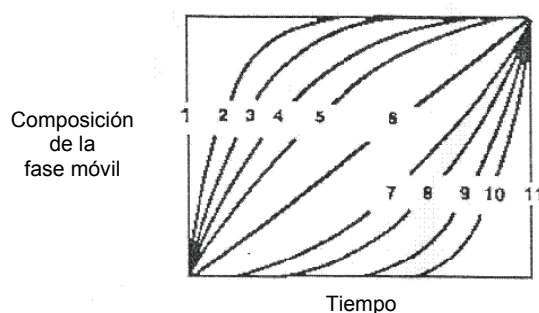
Se partió inicialmente de las condiciones utilizadas por E. Hebrero y col. en su trabajo [158].

- La fase móvil empleada estaba constituida por la mezcla de dos disolventes:
 - **Disolvente A:** Ácido Fórmico al 4.5%
 - **Disolvente B:** Acetonitrilo
- Todas las muestras de vino, así como los patrones puros, se inyectaron en el cromatógrafo, siendo el bucle del inyector de 20 μL .
- Las condiciones de gradiente de las que se partía fueron:

Tabla 8

t (min)	Flujo(ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	90	10	*
10	1.5	85	15	6
20	1.5	80	20	6
37.5	1.5	70	30	6

Con estas condiciones, para cada una de las columnas se modificó el gradiente y se ensayaron los distintos tipos de curvas que ofrecía el sistema cromatográfico (Fig.31), en función de los resultados que se obtenían en términos de resolución de picos, deriva de la línea base y tiempo total de análisis.

**Fig. 31 Curvas de gradiente disponibles en el sistema cromatográfico.**

Los estudios se realizaron con disoluciones de 1 ppm, a partir de la disolución madre, para todos los compuestos patrón.

A la vista de los máximos espectrales de cada sustancia, se escogieron como longitudes de onda óptimas para llevar a cabo la identificación de cada compuesto, la de 525 nm para las antocianinas y la de 280 nm para el resto de polifenoles.

Los compuestos estudiados para llevar a cabo la optimización de la separación se encuentran recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 9

Numero	Compuesto
1	Gálico
2	p-Hidroxibenzoico
3	p-Hidroxibenzaldehido
4	Cafeico
5	Epicatequina
6	p-Cumárico
7	Ferúlico
8	Delfinidina
9	Miricetina
10	Cianidina
11	Pelargonidina
12	Peonidina
13	Malvidina
14	Kempferol

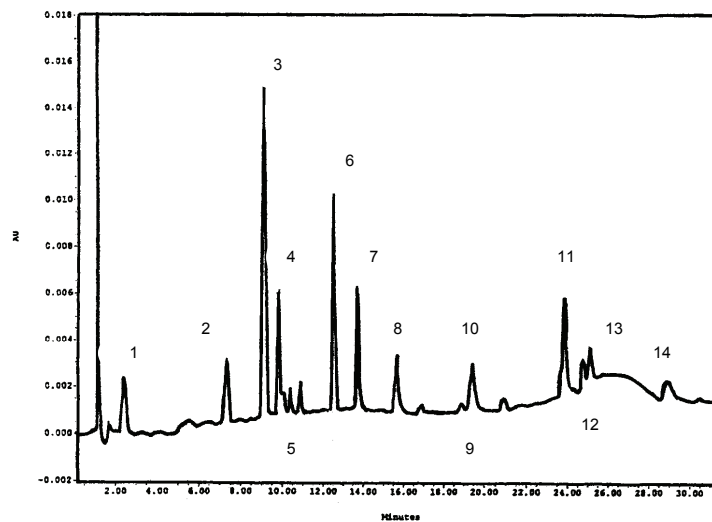
A) COLUMNA SPHERISORB**Tabla 10**

Ligando	Tamaño de partícula	Superficie de las partículas	Tamaño de poro	Carga de carbón
C18	5 μm	Esférica	80 Å	11.5%

Con esta columna los gradientes que dieron una mejor resolución fueron:

Gradiente 1:**Tabla 11**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	97	3	*
10	1.5	80	20	4
20	1.5	70	30	10

Cromatograma 1:**Fig. 32**

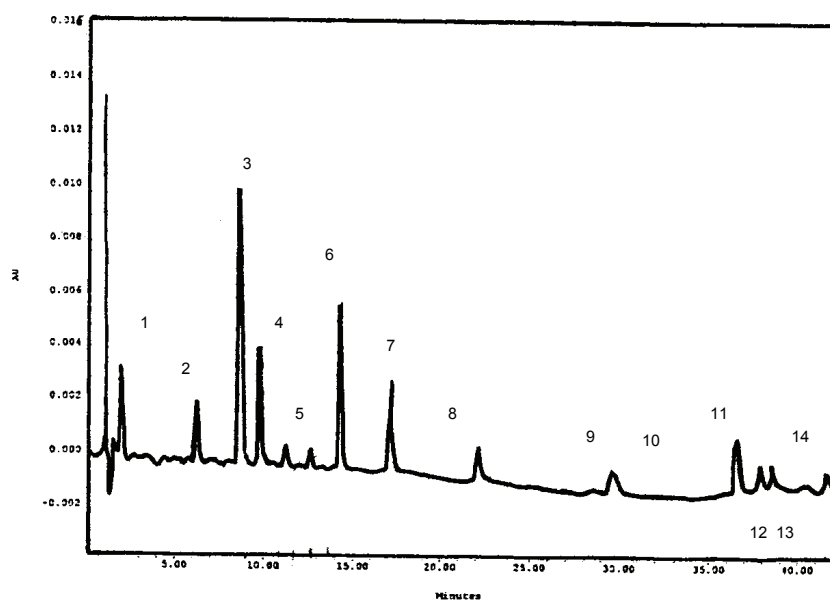
Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 1, fueron:

Tabla 12

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	2.37
p-Hidroxibenzoico	257.4	7.32
p-Hidroxibenzaldehído	285.7	9.14
Cafeico	323.6	9.85
Epicatequina	281.0	10.87
p-Cumárico	309.4	12.54
Ferúlico	323.6	13.74
Delfinidina	533.9	15.62
Miricetina	374.6	18.85
Cianidina	529.0	19.40
Pelargonidina	529.0	23.82
Peonidina	514.5	24.74
Malvidina	538.7	25.12
Kempferol	365.2	28.94

Gradiente 2:**Tabla 13**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	96	4	*
15	1.5	85	15	6
33	1.5	75	25	10
35	1.5	70	30	6

Cromatograma 2:**Fig. 33**

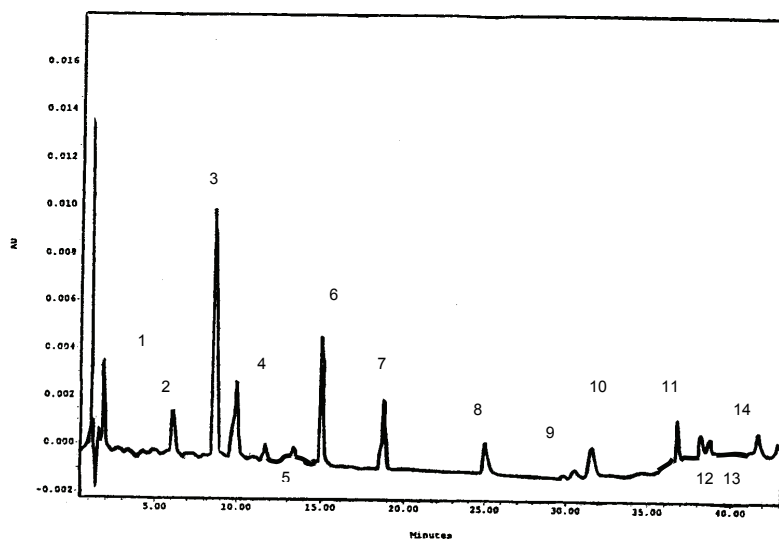
Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 2 fueron los que figuran en la tabla 14:

Tabla 14

Compuesto	λ_{\max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.98
p-Hidroxibenzoico	257.4	6.33
p-Hidroxibenzaldehido	285.7	8.71
Cafeico	323.6	9.86
Epicatequina	281.0	12.60
p-Cumárico	309.4	14.36
Ferúlico	323.6	17.20
Delfinidina	533.9	22.18
Miricetina	374.6	28.68
Cianidina	524.2	29.80
Pelargonidina	514.5	36.58
Peonidina	529.0	38.03
Malvidina	538.7	38.60
Kempferol	365.2	41.68

Gradiente 3:**Tabla 15**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	96	4	*
20	1.5	85	20	6
33	1.5	75	25	8
35	1.5	70	30	6

Cromatograma 3:**Fig. 34**

Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 3 fueron:

Tabla 16

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.88
p-Hidroxibenzoico	257.4	6.12
p-Hidroxibenzaldehído	285.7	8.60
Cafeico	323.6	9.91
Epicatequina	281.0	13.38
p-Cumárico	309.4	15.06
Ferúlico	323.6	18.71
Delfinidina	529.0	25.04
Miricetina	374.6	30.56
Cianidina	529.0	31.60
Pelargonidina	514.5	36.78
Peonidina	539.9	38.15
Malvidina	533.9	38.68
Kempferol	365.2	41.23

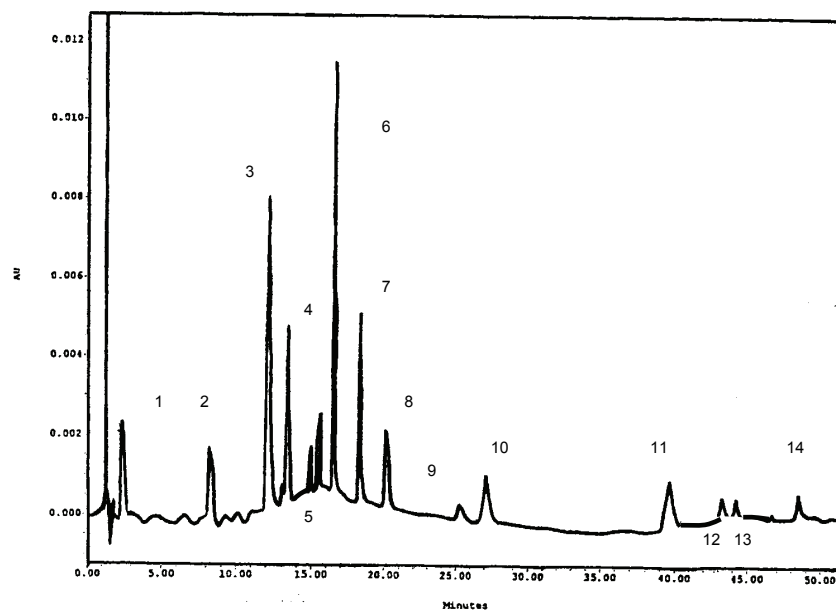
B) COLUMNA HYPERSIL**Tabla 17**

Ligando	Tamaño de partícula	Superficie de las partículas	Tamaño de poro	Carga de carbón
C18	5 μm	Esférica	120 Å	10%

Con esta columna los gradientes que dieron una mejor resolución fueron:

Gradiente 1:**Tabla 18**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	97	3	*
12	1.5	85	15	8
45	1.5	75	25	10
48	1.5	70	30	6

Cromatograma 1:**Fig. 35**

Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 1 fueron:

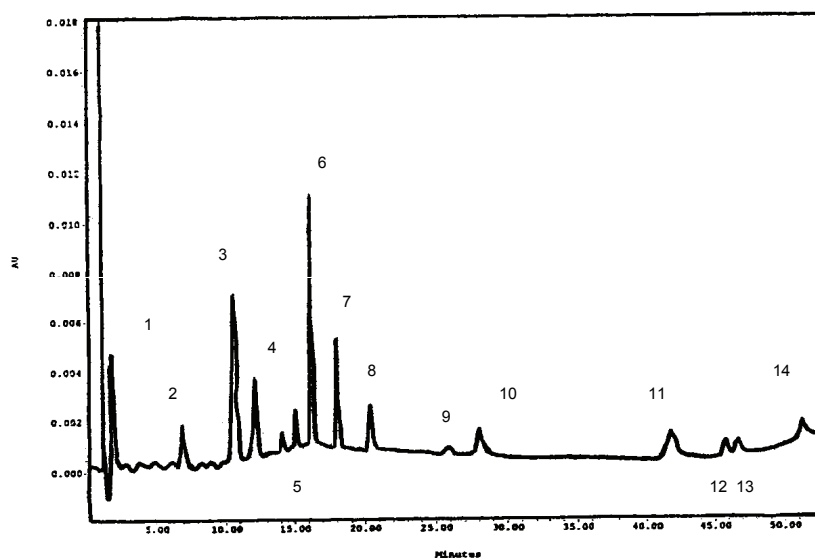
Tabla 19

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.93
p-Hidroxibenzoico	243.3	6.85
p-Hidroxibenzaldehido	285.7	10.60
Cafeico	323.6	12.07
Epicatequina	281.0	15.13
p-Cumárico	309.4	16.18
Ferúlico	323.6	18.07
Delfinidina	533.9	20.38
Miricetina	369.8	25.87
Cianidina	524.2	27.92
Pelargonidina	509.0	41.77
Peonidina	524.2	45.67
Malvidina	538.7	46.68
Kempferol	369.8	51.15

Gradiente 2:

Tabla 20

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	98	2	*
12	1.5	85	15	8
42	1.5	75	25	10
48	1.5	70	30	6

Cromatograma 2:**Fig. 36**

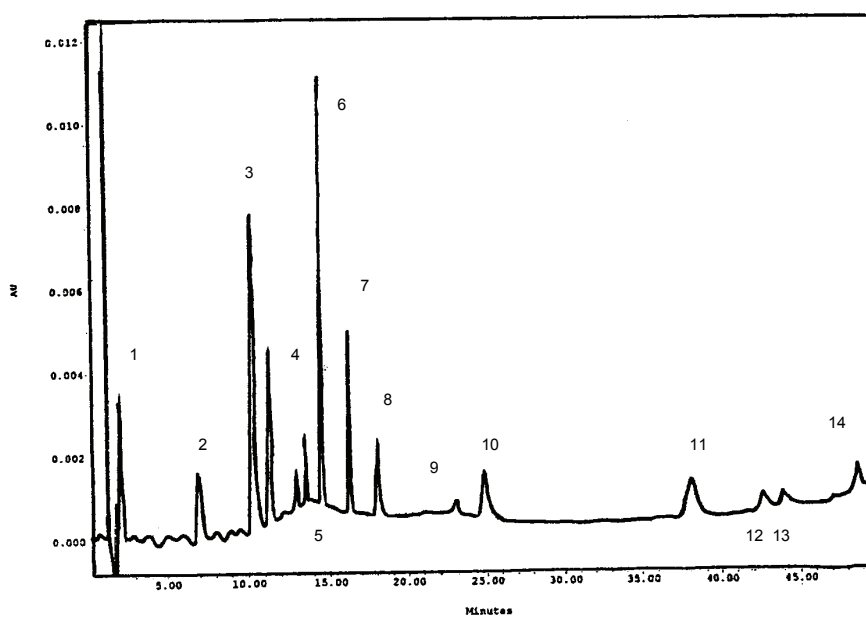
Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 2 fueron:

Tabla 21

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	2.32
p-Hidroxibenzoico	257.4	8.29
p-Hidroxibenzaldehído	285.7	12.13
Cafeico	323.6	13.41
Epicatequina	281.0	15.54
p-Cumárico	309.4	16.54
Ferúlico	323.6	18.33
Delfinidina	533.9	20.16
Miricetina	369.8	25.31
Cianidina	519.3	27.08
Pelargonidina	514.5	39.61
Peonidina	533.9	43.23
Malvidina	538.7	44.19
Kempferol	365.2	48.46

Gradiente 3:**Tabla 22**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	93	7	*
10	1.5	80	20	8
43	1.5	75	25	9
46	1.5	70	30	6

Cromatograma 3:**Fig. 37**

Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 3 fueron:

Tabla 23

Compuesto	λ_{\max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	2.05
p-Hidroxibenzoico	243.3	6.95
p-Hidroxibenzaldehído	285.7	10.33
Cafeico	323.6	11.35
Epicatequina	281.0	13.51
p-Cumárico	309.4	14.53
Ferúlico	323.6	16.26
Delfinidina	529.0	18.05
Miricetina	369.8	23.03
Cianidina	519.3	24.80
Pelargonidina	514.5	38.08
Peonidina	519.3	42.55
Malvidina	533.9	43.86
Kempferol	365.2	48.58

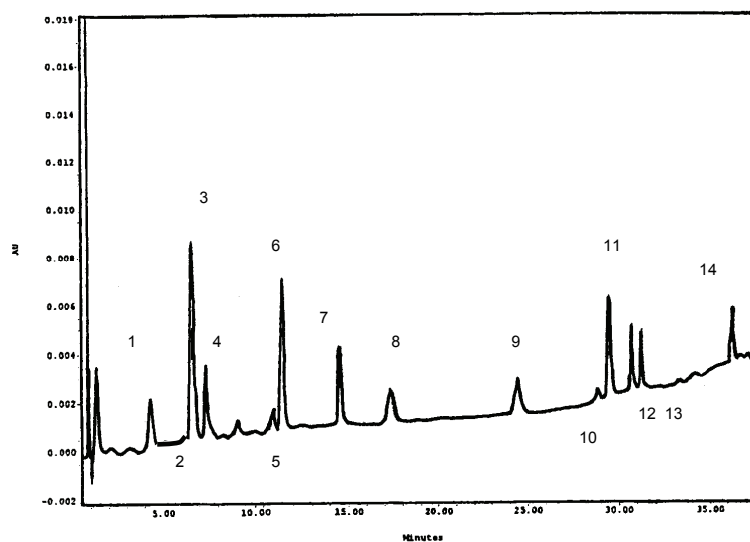
C) COLUMNA NOVA-PAK C18**Tabla 24**

Ligando	Tamaño de partícula	Superficie de las partículas	Tamaño de poro	Carga de carbón
C18	4 μm	Esférica	60 Å	7%

Con esta columna los gradientes que dieron una mejor resolución fueron:

Gradiente 1:**Tabla 25**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	97	3	*
10	1.5	90	10	6
27	1.5	80	20	10
33	1.5	70	30	6

Cromatograma 1:**Fig. 38**

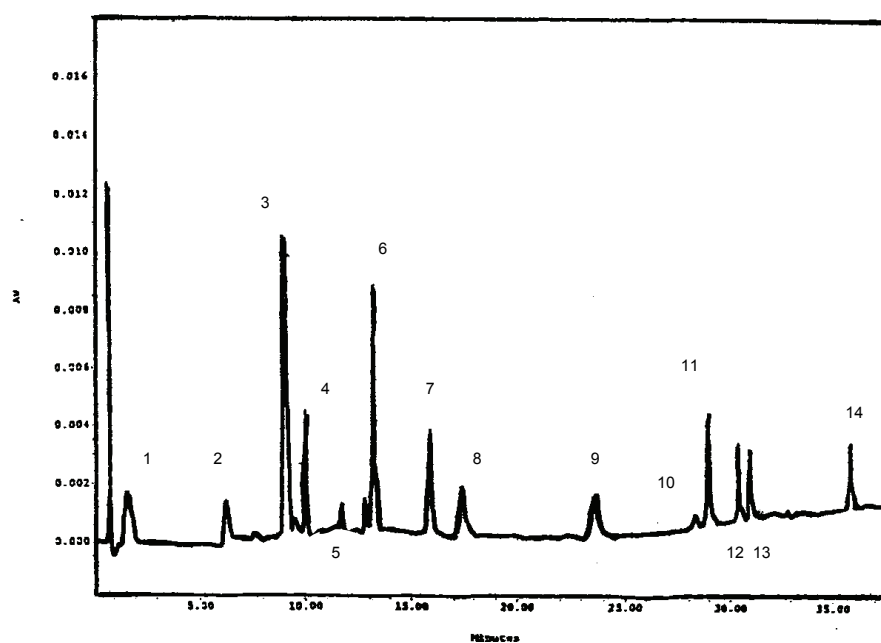
Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 1 fueron:

Tabla 26

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.29
p-Hidroxibenzoico	257.4	4.34
p-Hidroxibenzaldehído	285.7	6.59
Cafeico	323.6	7.32
Epicatequina	281.0	10.94
p-Cumárico	309.4	11.44
Ferúlico	323.6	14.58
Delfinidina	524.2	17.27
Cianidina	524.2	24.44
Miricetina	369.8	28.84
Pelargonidina	514.5	29.45
Peonidina	524.2	30.71
Malvidina	533.9	31.26
Kempferol	365.2	36.21

Gradiente 2:**Tabla 27**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	100	0	*
10	1.5	85	15	6
27	1.5	75	25	10
33	1.5	70	30	6

Cromatograma 2:**Fig. 39**

Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 2 fueron:

Tabla 28

Compuesto	λ_{max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.55
p-Hidroxibenzoico	257.4	6.26
p-Hidroxibenzaldehido	285.7	9.07
Cafeico	323.6	9.99
Epicatequina	281.0	12.79
p-Cumárico	309.4	13.21
Ferúlico	323.6	15.92
Delfinidina	529.0	17.47
Miricetina	369.8	23.67
Cianidina	524.2	28.26
Pelargonidina	509.6	28.96
Peonidina	514.2	30.41
Malvidina	533.9	31.02
Kempferol	365.2	35.86

Gradiente 3:**Tabla 29**

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
0	1.5	98	2	*
10	1.5	80	20	4
27	1.5	75	25	10
33	1.5	70	30	6

Cromatograma 3:

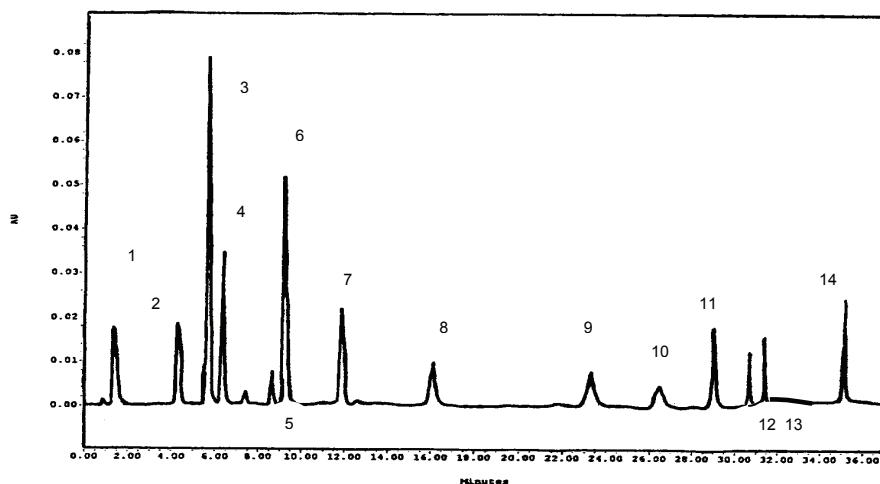


Fig. 40

Los tiempos de retención y longitudes de onda características, en el espectro para cada compuesto con el gradiente 3 fueron:

Tabla 30

Compuesto	λ_{\max} (nm)	t_R (min)
Gálico	271.5	1.42
p-Hidroxibenzoico	257.3	4.54
p-Hidroxibenzaldehido	285.6	6.00
Cafeico	323.6	6.62
Epicatequina	280.9	9.00
p-Cumárico	309.3	9.72
Ferúlico	323.6	12.57
Delfinidina	529.0	16.79
Cianidina	524.2	24.64
Miricetina	369.8	27.52
Pelargonidina	509.6	29.67
Peonidina	524.2	31.00
Malvidina	533.9	31.67
Kempferol	365.2	35.75

En base a lo que anteriormente se comentó en este trabajo (págs. 46-47), se escogió como gradiente óptimo para llevar a cabo el análisis este último.

Tratamiento de datos

La identificación de los picos en los cromatogramas se hizo comparando sus tiempos de retención con los que se obtuvieron anteriormente en las mezclas de compuestos polifenólicos puros, y a través de sus espectros los cuales se comparaban con los característicos de los compuestos puros. Para todo esto, la posibilidad de almacenarlos en el software del programa fue fundamental, de modo que se creó una librería con los espectros de los patrones puros con objeto de poder contrastarlos con los obtenidos en las muestras reales y poder así realizar la identificación.

Para obtener la librería se inyectaron todos los patrones a una concentración de 16 ppm, en las condiciones elegidas para separar los polifenoles en los vinos. Una vez obtenido el cromatograma de los patrones se seleccionaron sus picos y se guardó el espectro correspondiente junto con el tiempo de retención en una librería. Estos espectros, se podían superponer con los de los picos de otros cromatogramas para realizar así la identificación.

Para cada uno de estos compuestos identificados se calculó también el área del pico, para proceder al análisis cuantitativo.

Uno de los objetivos de este trabajo es llevar a cabo la identificación y cuantificación de dichos compuestos. Sin embargo, debido a que presentan tiempos de retención y espectros de absorción muy similares se han complementado dichos estudios con la utilización de la Cromatografía Líquida acoplada a la Espectrometría de Masas (HPLC/MS).

4.2- HPLC/MS

El acoplamiento HPLC/MS se ha utilizado satisfactoriamente en diversas aplicaciones [159-167]. La espectrometría de masas con ionización por electrospray (ES/MS) ha emergido como una poderosa técnica para la caracterización de biomoléculas y es la técnica de ionización más versátil que existe hoy en día [168-171]. ES/MS ofrece ventajas en términos de sensibilidad y capacidad para el análisis de un gran número de compuestos termolábiles, altamente polares y no volátiles [161, 172]. Esta técnica ha sido usada para la caracterización de antocianinas en diferentes extractos [165, 173] y acoplada a HPLC es muy poderosa para llevar a cabo dicha caracterización [162, 174].

Para poner a punto el método a emplear se hicieron pruebas utilizando distintas composiciones de fase móvil así como diferentes gradientes. La columna escogida para llevar a cabo todos los análisis fue la misma que se utilizó con el equipo HPLC/DAD, una **Nova-Pak C18** cuyas características son:

Tabla 31

Ligando	Tamaño de partícula	Superficie de las partículas	Tamaño de poro	Carga de carbón
C18	4 μm	Esférica	60 Å	7%

Los compuestos con los que se llevó a cabo la optimización de la separación fueron los que se encuentran recogidos en la tabla 32:

Tabla 32

Numero	Compuesto
1	Gálico
2	p-Hidroxibenzoico
3	p-Hidroxibenzaldehído
4	Cafeico
5	p-Cumárico
6	Epicatequina
7	Ferúlico
8	Delfinidina
9	Cianidina
10	Pelargonidina
11	Peonidina
12	Malvidina

Los estudios se realizaron con disoluciones de 2 ppm a partir de la disolución madre para todos los compuestos patrón. Se utilizó una concentración distinta que en el equipo de HPLC, debido a que si se utilizaba una concentración de 1 ppm no se distinguían bien los compuestos del ruido de la línea base.

Como puede observarse en la tabla 32, la separación en HPLC/MS, se optimizó con dos compuestos menos que en HPLC, que fueron kempferol y miricetina, y ello fue debido a que para poder apreciarlos y distinguirlos de la línea

base, era necesario inyectarlos en una concentración mucho mayor que el resto de los compuestos (la miricetina a 10 ppm y el kempferol a más de 15 ppm).

Las condiciones experimentales del equipo utilizadas para llevar a cabo las distintas pruebas fueron:

- Modo de ionización: API-ES
- Electrospray positivo
- Modo de operación: SIM
- Flujo de gas de secado: 13.0 L/min
- Presión del nebulizador: 60 psig
- Temperatura del gas de secado: 350 °C
- Fragmentador: 60V
- Resolución SIM: baja

Dichas condiciones experimentales se comentan brevemente a continuación:

▪ El equipo con el que se realizaron las pruebas utiliza como **Interfase** la ionización a presión atmosférica (API) dentro de la cual permite escoger entre dos modos de ionización:

- ES: Electrospray
- APCI: Ionización química a presión atmosférica

En nuestro trabajo se escogió API-ES ya que es la técnica recomendada para analizar compuestos térmicamente inestables y además con ella, se obtiene una mayor sensibilidad y un menor ruido de fondo que con APCI.

Con Electrospray se puede trabajar en modo positivo o en modo negativo. Para el análisis de antocianinas los fabricantes del equipo con el que se ha trabajado recomiendan utilizar Electrospray positivo.

▪ El equipo también permite trabajar con dos modos de operación: **modo SCAN y modo SIM**.

El modo SCAN se utiliza para el análisis cualitativo ya que con él se monitorizan rangos continuos de valores de m/z y además proporciona información general sobre los componentes de una mezcla.

El modo SIM se utiliza cuando se quiere que el detector monitorice iones específicos por lo que tiene una mayor sensibilidad, especificidad y precisión que el modo SCAN para cuantificar compuestos conocidos.

▪ Como **Flujo de gas de secado** se escogió el máximo que permitía el equipo (13.0 L/min) ya que se utilizaron fases móviles con gran cantidad de agua. Así se asegura la completa evaporación de todas las gotitas formadas para

que no aparezcan picos fantasma en los espectros. El manual del equipo recomienda que cuando se utilicen flujos de las fases móviles mayores de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ se utilice un flujo de gas de secado de 13 L/min.

- Se escogió como **Presión del nebulizador** 60 psig ya que este parámetro depende del flujo y de la composición de la fase móvil empleada y también depende del modo de ionización. El manual del equipo recomienda que para flujos mayores de 1 mL/min se debe utilizar una presión de 60 psig.

- La **Temperatura del gas de secado** controla la temperatura del gas nitrógeno. Se debe utilizar la máxima que permite el equipo (350°C) a no ser que se usen disolventes altamente volátiles.

- El **Fragmentador** puede ir de 0 a 400 Voltios. La fragmentación se produce por colisión con moléculas de nitrógeno de los iones acelerados. Este parámetro proporciona información estructural para análisis cualitativos y proporciona iones confirmatorios para análisis cuantitativos.

Se escogió el valor de 60 Voltios por ser un valor adecuado para el análisis en general de compuestos polifenólicos.

- El equipo, para el parámetro de **Resolución SIM**, ofrece dos posibilidades: resolución SIM Alta o resolución SIM Baja. Mide la tolerancia del ión que va a ser registrado y en resolución Baja puede dar mejores límites de detección que en resolución Alta.

Para hacer la elección de las fases móviles y del gradiente a utilizar se probaron distintas condiciones experimentales encontradas en la bibliografía. Para comenzar se partió de las condiciones experimentales optimizadas y puestas a punto por Hebrero y col. [158] (las condiciones de partida utilizadas con el equipo HPLC). Con ellas no se consiguió la separación deseada, ya que los compuestos eluían muy pronto solapándose el ácido p-cumárico y la epicatequina.

Dado que no se conseguía una buena separación, se probaron las condiciones experimentales utilizadas por Baldi y col. [174] que eran:

- **Disolvente A:** ácido fórmico/ agua (7/93)
- **Disolvente B:** agua/acetonitrilo/metanol/ácido fórmico (47/23/23/7)

Las condiciones de gradiente de las que se partía fueron:

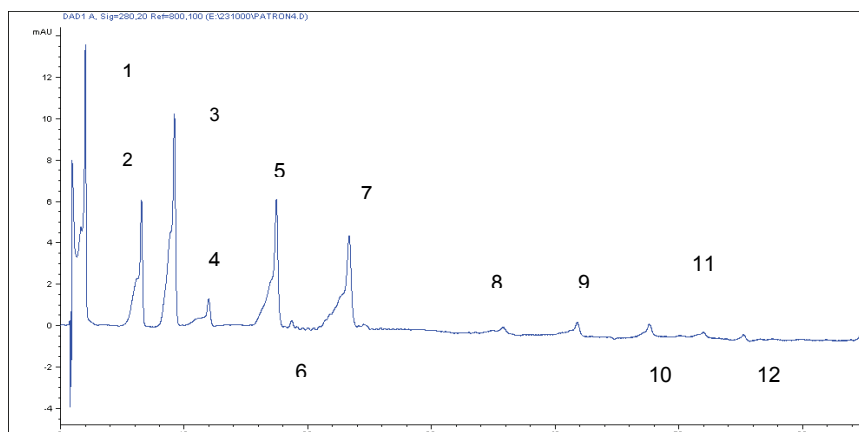
Tabla 33

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	1.5	100	0
30	1.5	75	25
60	1.5	50	50

Con este gradiente se separaban todos los compuestos en 60 minutos, pero debido a que se utilizaba un gran porcentaje de ácido fórmico se intentó reducir la cantidad del mismo y se consiguió una buena separación utilizando el mismo gradiente y las siguientes fases móviles, donde el fórmico se redujo al 3% :

- **Disolvente A:** ácido fórmico/ agua (3/97)
- **Disolvente B:** agua/acetonitrilo/metanol/ácido fórmico (51/23/23/3)

Con estas condiciones la separación obtenida fue:

**Fig. 41**

A continuación, se intentó reducir el tiempo de análisis a partir de estas condiciones optimizadas pero esto no se consiguió por lo que se siguieron haciendo otras pruebas modificando la composición de la fase móvil.

Se ensayaron las condiciones experimentales puestas a punto por Revilla y col. [175].

La fase móvil empleada estaba constituida por la siguiente mezcla:

- **Disolvente A:** ácido fórmico/ agua (10/90)
- **Disolvente B:** agua/metanol/ácido fórmico (45/45/10)

Las condiciones de gradiente de las que se partía fueron:

Tabla 34

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	0.8	65	35
20	0.8	5	95
25	0.8	0	0

Con estas condiciones las antocianinas salían antes de los 15 minutos por lo que se solapaban con los otros polifenoles. Se hicieron entonces diferentes pruebas cambiando los porcentajes de A y B, así como el tiempo, con la finalidad de aumentar la retención de las antocianinas; sin embargo, no fue posible conseguir una separación adecuada ya que siempre se solapaban algunos compuestos.

Después se probó con el gradiente utilizado con el equipo de HPLC/DAD (gradiente 3, página 60) y se fue modificando dicho gradiente para ver si se conseguía mejorar la resolución de los picos. Las fases móviles que se utilizaron fueron:

- **Disolvente A:** ácido fórmico/ agua (4.5/95.5)
- **Disolvente B:** acetonitrilo

El mejor gradiente obtenido fue:

Tabla 35

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	1.5	98	2
10	1.5	83	17
25	1.5	75	25
30	1.5	70	30

La separación obtenida fue:

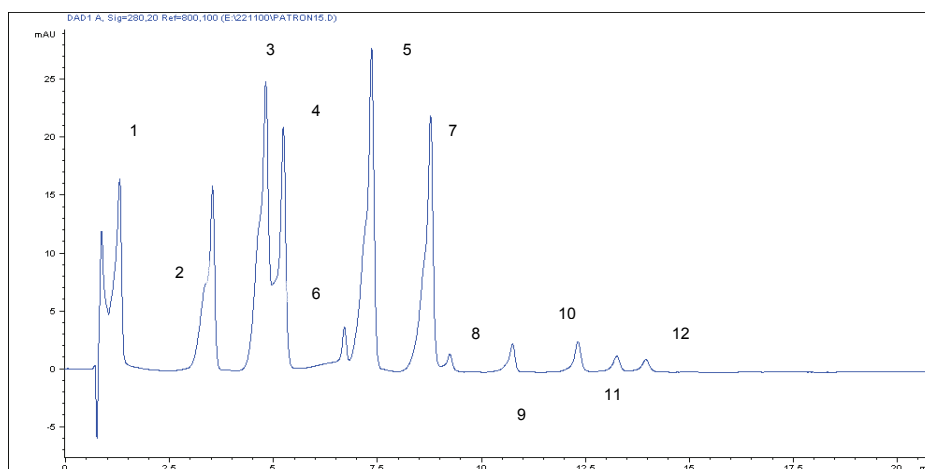


Fig. 42

Como se puede ver en la figura, el tiempo de análisis fue relativamente corto (15 minutos) pero había dos picos que no se resolvían satisfactoriamente (el pico 3 y el 4). Estos dos picos correspondían a p-hidroxibenzaldehído y al ácido cafeico.

Cambiando el disolvente B por metanol en lugar de acetonitrilo y utilizando estas mismas condiciones, se obtuvo una separación muy similar a la anterior (se seguían solapando p-hidroxibenzaldehído y cafeico y el tiempo de análisis seguía siendo de 15 minutos) pero la intensidad de la señal era algo mayor en este último caso.

Se siguieron haciendo pruebas para ver si se conseguían obtener unas condiciones cromatográficas, con las que se resolviese la separación satisfactoriamente para todos los compuestos estudiados.

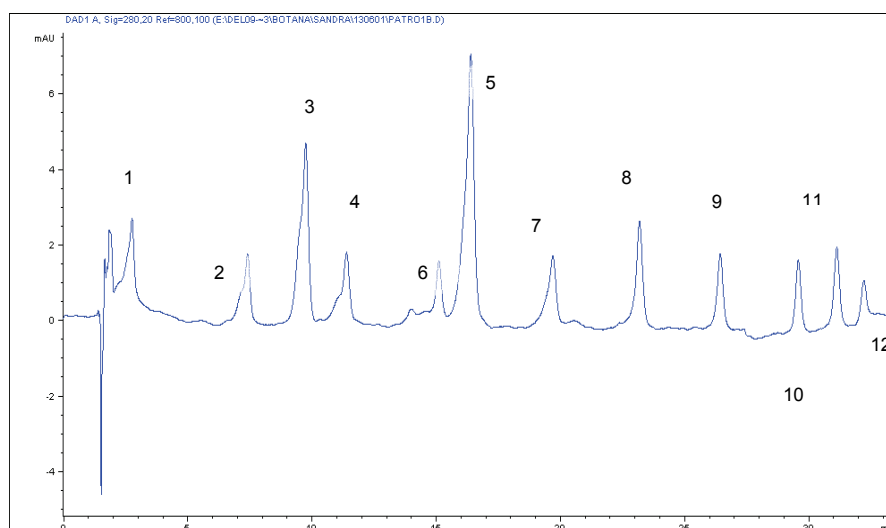
Los mejores resultados obtenidos fueron los siguientes:

- **Disolvente A:** ácido fórmico/ agua (3/97)
- **Disolvente B:** ácido fórmico/acetonitrilo/metanol/agua (3/38/38/21)

Tabla 36

t (min)	Flujo (ml/min)	%A	%B
0	1	95	5
15	1	80	20
30	1	60	40

La separación obtenida fue:

**Fig. 43**

Una vez puesto a punto el método de análisis se calculó la repetibilidad del método así como el rango de linealidad y los límites de detección y cuantificación. Para ello, se trabaja en modo SIM ya que los compuestos que se inyectan eran conocidos. Fue necesario saber qué fragmentador era el adecuado utilizar para cada uno de los compuestos que se iban a analizar y lo que se hizo fue inyectar cada compuesto por separado utilizando cada uno de los distintos fragmentadores y ver con cuál de ellos se obtenía una mayor abundancia para el ión molecular.

En la tabla 37 se muestra el voltaje del fragmentador escogido para cada uno de los compuestos estudiados:

Tabla 37

COMPUESTO	Fragmentador (Voltios)
Gálico	50
p-Hidroxibenzoico	50
p-Hidroxibenzaldehido	80
Cafeico	80
Epicatequina	60
p-Cumárico	90
Ferúlico	90
Delfinidina	120
Cianidina	130
Pelargonidina	130
Peonidina	100
Malvidina	110

4.3- ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD DE LOS MÉTODOS OPTIMIZADOS

El estudio de la repetibilidad de un procedimiento es de gran importancia para conocer los factores que pueden influir en la medida. La precisión de las medidas obtenidas para el análisis de n réplicas de una misma muestra viene dado por la desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV), aunque la IUPAC recomienda que se utilice el término de desviación estándar relativa y que se calcula según la siguiente ecuación:

$$DER(\%) = (S / \bar{X}) \cdot 100$$

donde:

$S \rightarrow$ *Desviación estándar*: informa sobre la dispersión de los resultados alrededor del valor medio y tiene en cuenta el número de grados de libertad ($n - 1$) del conjunto de resultados considerados.

$\bar{X} \rightarrow$ *Media aritmética*: es un parámetro que representa la estimación del valor verdadero de la población.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Para su cálculo se inyectaron disoluciones que contenían los patrones a estudiar 5 veces durante 4 días (a una concentración de 1 ppm para HPLC y a una concentración de 2 ppm para HPLC/MS). Esto permitió obtener 20 cromatogramas para estudiar la repetibilidad de los resultados: se calculó para cada compuesto la desviación estándar relativa (DER) de las áreas obtenidas en las 20 inyecciones totales.

4.3.1- HPLC

Las desviaciones estándar relativas obtenidas para cada compuesto a una concentración de 1 ppm son las que figuran en la tabla 38:

Tabla 38

Compuesto	DER (%)
Gálico	3.51
p-hidroxibenzoico	3.24
p-hidroxibenzaldehido	1.14
Cafeico	2.85
Epicatequina	5.09
p-cumárico	2.45
Ferúlico	2.80
Delfinidina	5.32
Cianidina	4.65
Miricetina	5.00
Pelargonidina	3.03
Peonidina	3.54
Malvidina	3.80
Kempferol	3.65

4.3.2- HPLC/MS

Dado que el equipo HPLC/MS tiene una menor sensibilidad que el equipo de HPLC, fue necesario inyectar todos los compuestos a una mayor concentración para poder distinguirlos del ruido de la línea base.

Las desviaciones estándar relativas para cada compuesto a una concentración de 2 ppm, excepto la epicatequina de la que se inyectaron 4 ppm (debido a que a 2 ppm aún no se distinguía bien del ruido de la línea base), se muestran en la tabla 39:

Tabla 39

Compuesto	DER (%)
Gálico	4.44
p-hidroxibenzoico	4.80
p-hidroxibenzaldehido	3.47
Cafeico	4.73
Epicatequina	14.11
p-cumárico	2.42
Ferúlico	2.34
Delfinidina	3.16
Cianidina	3.13
Pelargonidina	6.35
Peonidina	6.61
Malvidina	1.63

4.4- ESTUDIO DEL RANGO DE LINEALIDAD

El estudio del rango de linealidad permite interpolar las áreas de los picos de las muestras y obtener la concentración de estos compuestos en los vinos. Para su cálculo se han ido inyectando mezclas de todos los patrones a distintas concentraciones. Se empezó inyectando los patrones a 1 ppm e incrementando progresivamente hasta 16 ppm. A continuación se hizo lo mismo, pero disminuyendo la concentración hasta 0.06 ppm en el caso del equipo de HPLC; para HPLC/MS la concentración más baja que se conseguía detectar y distinguir del ruido era 0.125 ppm.

4.4.1- HPLC

Los resultados obtenidos para la relación lineal se recogen en la tabla 40 y se muestran en las figuras 44 a 57.

Tabla 40

	0.08 ppm	0.15 ppm	0.26 ppm	0.50 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm	8 ppm	16 ppm
Calico	2385	3227	6311	15388	34888	72988	134831	263849	538889
p-Hidroxibenzoico	1671	3437	5045	11462	27339	59705	104833	211149	434679
p-Hidroxibenzoaldehído	8363	10327	22905	49579	108135	228832	410273	810135	1730464
Canélico	2492	4901	9823	19810	44368	90242	172349	341759	727830
Epicatequina	267	1097	1872	4190	9647	20968	37228	77349	157884
p-Cumárico	9623	7762	16636	32968	73529	154790	289081	596229	1216266
Ferúlico	1813	3149	6986	14961	32903	70743	129620	259210	567109
Dehidrina	360	2066	4064	8881	19684	41880	86705	174684	365363
Clavicina	(*)	2841	5717	9190	21749	47849	89689	190063	409901
Miricaína	410	962	2647	2963	12728	30084	53910	119028	23909
Perilordina	1840	3460	6891	14036	29747	60188	118890	232136	463889
Perordina	873	1308	2484	5298	11912	24488	47710	97846	20008
Metudina	1828	1968	3067	6726	14737	31741	57688	117826	249002
Kempferol	1383	2371	4966	10364	22960	53034	93141	191477	406066

(*) No se aprecia el pico en el cromatograma

Al representar gráficamente estos resultados se obtienen las siguientes rectas:

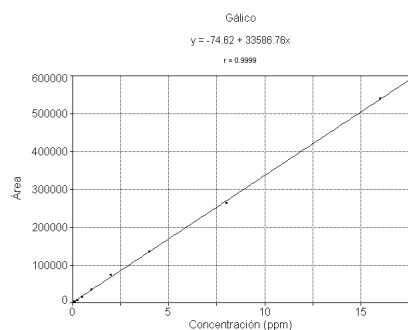


Fig. 44

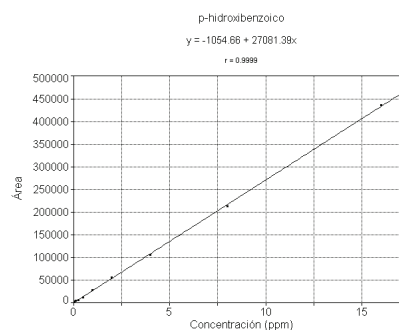


Fig. 45

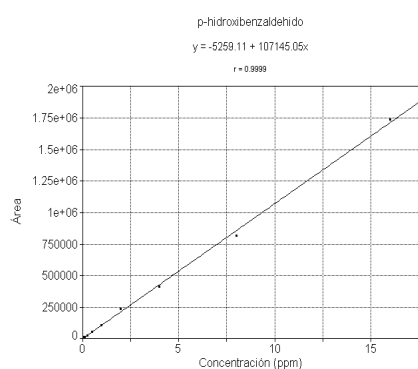


Fig. 46

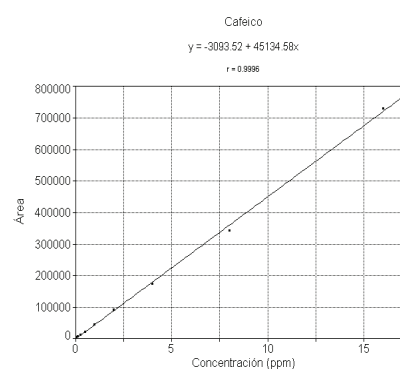


Fig. 47

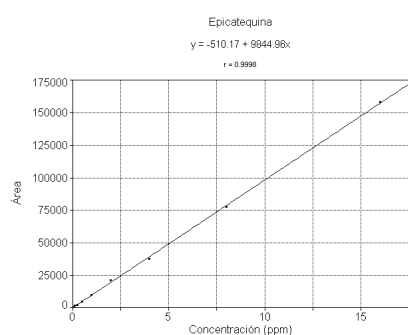


Fig. 48

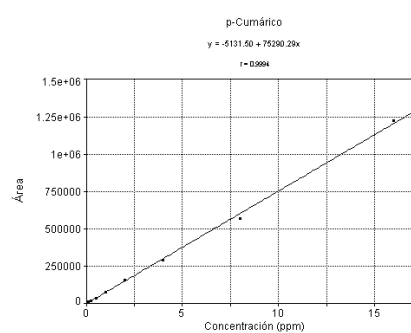
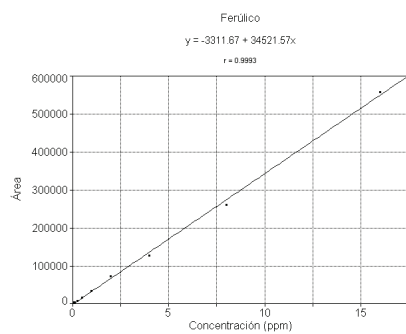
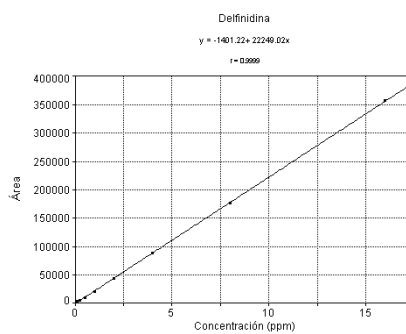
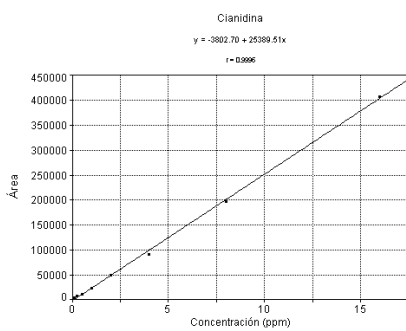
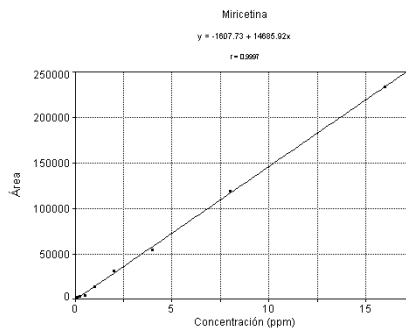
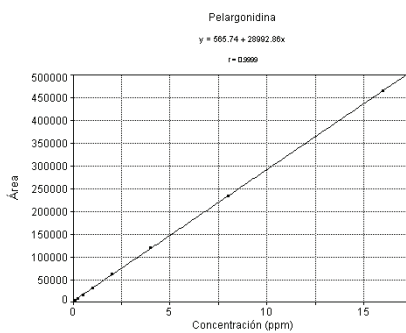
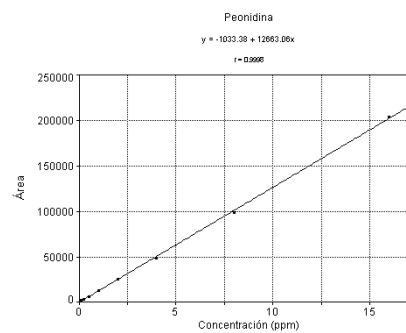
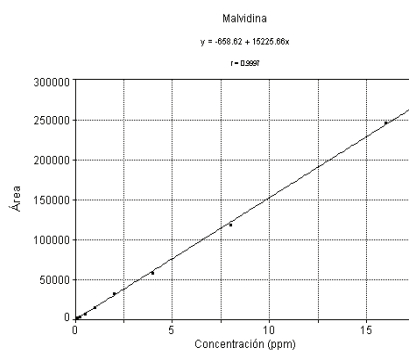
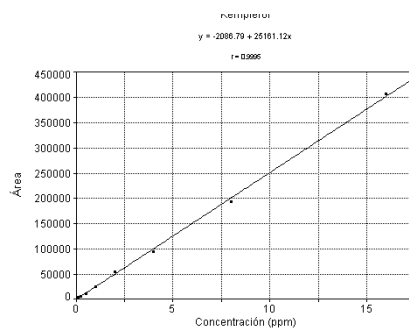


Fig. 49

**Fig. 50****Fig. 51****Fig. 52****Fig. 53****Fig. 54****Fig. 55**

**Fig. 56****Fig. 57**

4.4.2- HPLC/MS

Los resultados obtenidos para la relación lineal se muestran en la tabla 41 y aparecen representados en las figuras 58 a 69. A la vista de los resultados en cuanto a límite de detección y cuantificación (que se detallan en la sección 4.5), se realizaron dos inyecciones a mayores para el ácido gálico y el ácido p-hidroxibenzoico a 10 y 12 ppm. Análogamente para epicatequina y peonidina se hicieron inyecciones a 6 y 12 ppm respectivamente.

Tabla 41

	0.125 ppm	0.25 ppm	0.50 ppm	1 ppm	2 ppm	4 ppm	8 ppm	16 ppm
Galico	○	○	○	○	10109	26438	57924	107948
p-Hidroxibenzol	○	○	○	○	37414	72925	145380	291284
p-Hidroxibenzaldehído	○	○	232624	47183	93611	188841	374870	758862
Cateico	○	○	○	32001	66584	128290	253037	505749
Epicatequina	○	○	12904	20651	72769	143758	276983	363854
p-cumárico	○	○	○	169944	32992	64603	129938	276053
Ferulico	○	○	23321	49826	98844	198168	390237	667011
Demetila	62136	124565	246038	496381	986907	1920310	3884050	6361700
Cateidina	269137	366609	621611	120058	3145410	4731160	7993680	12682000
Pelargonidina	196332	364297	641098	1283260	2900390	6486860	9054750	13512300
Peonidina	166630	317084	969011	2252620	2754900	4542860	7345960	11798700
Mauidina	142448	203061	402496	745306	1519860	7740070	8136280	1383390

○ No se aprecia el pico en el cromatograma

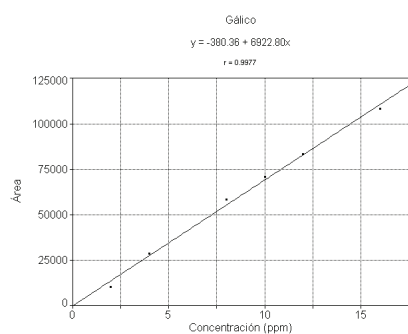


Fig. 58

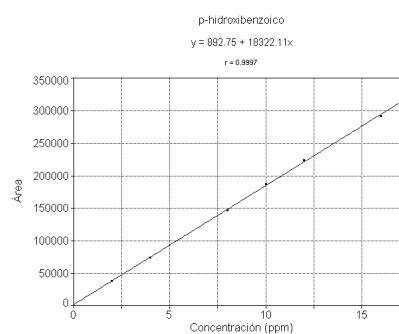


Fig. 59

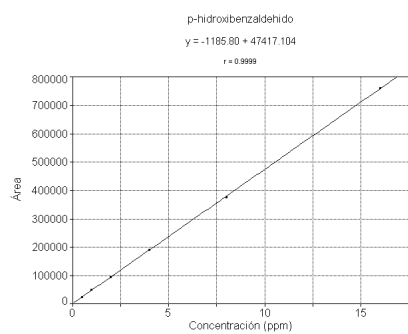


Fig. 60

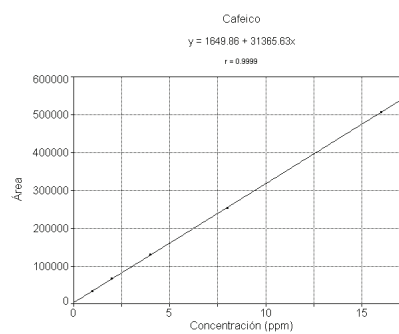


Fig. 61

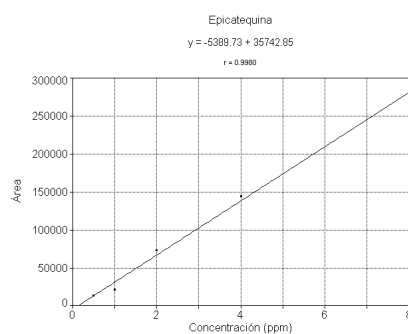


Fig. 62

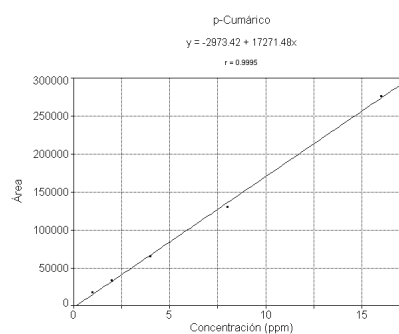
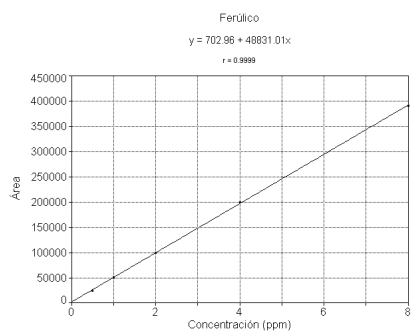
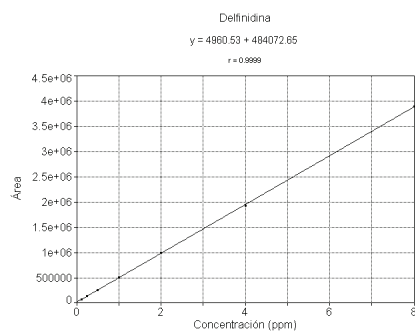
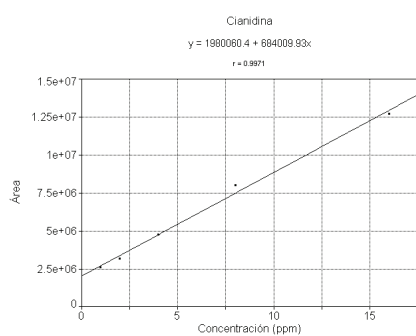
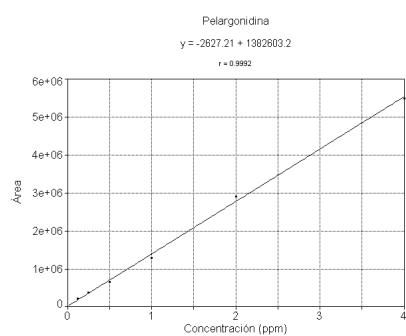
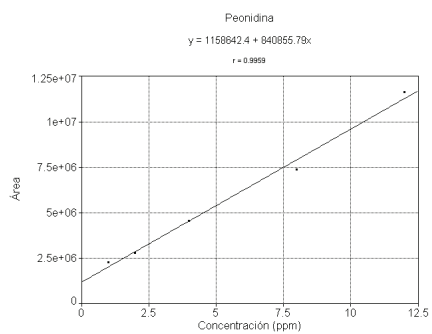
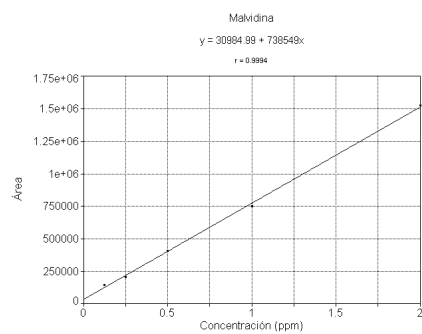


Fig. 63

**Fig. 64****Fig. 65****Fig. 66****Fig. 67****Fig. 68****Fig. 69**

4.5- LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. Se puede definir el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B :

$$\text{LOD} = y_B + 3 s_B$$

El límite de cuantificación (LOQ) o límite de determinación, puede definirse como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa.

$$\text{LOQ} = y_B + 10 s_B$$

Los cálculos se realizaron con el programa Quimiometría Práctica incluido en el libro *Avances en Quimiometría Práctica* [176].

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación se preparó una *disolución madre* que contenía a todos los compuestos patrón en concentraciones de 25 ppm. A partir de ésta se prepararon otras disoluciones, por dilución con metanol acidificado con HCl al 0.1%, de todos los patrones desde 16 ppm hasta 0.0078 ppm, debido a que a esta concentración no se apreciaban picos en el cromatograma.

4.5.1- HPLC

Los resultados obtenidos para el límite de detección y para el límite de cuantificación en el equipo de HPLC son los que se muestran en la tabla 42:

Tabla 42

COMPUESTO	Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
Gálico	0.09	0.32
p-Hidroxibenzoico	0.11	0.37
p-Hidroxibenzaldehído	0.16	0.53
Cafeico	0.18	0.60
Epicatequina	0.12	0.39
p-Cumárico	0.18	0.62
Ferúlico	0.20	0.67
Delfinidina	0.19	0.64
Cianidina	0.23	0.76
Miricetina	0.19	0.62
Pelargonidina	0.05	0.16
Peonidina	0.12	0.41
Malvidina	0.13	0.42
Kempferol	0.19	0.64

4.5.2- HPLC/MS

En la tabla 43 se muestran los resultados obtenidos para el límite de detección y para el límite de cuantificación en el equipo HPLC/MS:

Tabla 43

COMPUESTO	Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)
Gálico	1.00	3.35
p-Hidroxibenzoico	0.34	1.15
p-Hidroxibenzaldehido	0.07	0.23
Cafeico	0.06	0.19
Epicatequina	0.71	2.34
p-Cumárico	0.46	1.54
Ferúlico	0.99	3.29
Delfinidina	0.84	2.81
Cianidina	1.16	3.86
Pelargonidina	0.52	1.73
Peonidina	1.08	3.61
Malvidina	0.06	0.20

5. APLICACIÓN DEL MÉTODO A VINOS TINTOS



Una vez establecida la metodología analítica a utilizar tanto para HPLC como para HPLC/MS, se aplicó el método optimizado a vinos tintos gallegos comerciales.

5.1- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Tanto para el análisis por HPLC como para HPLC/MS, se llevó a cabo el mismo tratamiento de las muestras: se centrifugaban las muestras durante 20 minutos a 3500 r.p.m. y a continuación se filtraban a través de filtros de nylon de 0.45 μm . Se inyectaban 20 μL y la disolución restante se guardaba en el congelador para posibles análisis posteriores.

5.2- TRATAMIENTO DE DATOS

5.2.1- HPLC

La cromatografía es fundamentalmente una técnica de separación, que puede informar acerca del número de sustancias químicas existentes en una mezcla, pero no da información sobre su naturaleza. Puede ocurrir que dos sustancias distintas tengan tiempos de retención muy semejantes, lo cual dificulta la identificación de las mismas.

El acoplamiento directo de potentes sistemas de detección, permite obtener información de algunos espectros de estas sustancias de forma prácticamente instantánea.

ANÁLISIS CUALITATIVO

Una vez seleccionadas las condiciones de separación óptimas para las muestras de los patrones, se pasó a inyectar los vinos en el cromatógrafo e identificar los polifenoles que los componen a partir de los picos de los cromatogramas.

Una primera aproximación para la identificación de los picos resultantes fue la comparación con los tiempos de retención obtenidos para los patrones (tabla 44).

A lo largo de las experiencias realizadas, se pudo comprobar cómo una misma muestra inyectada varias veces en las mismas condiciones de gradiente seleccionado, presenta variaciones en los tiempos de retención, sobre todo en las zonas donde éstos eran más elevados, debido quizás a la mayor anchura de los picos. Incluso en algunas experiencias, el tiempo de retención de un determinado compuesto se modificaba en función de la presencia o ausencia de otros. En

algunos casos picos muy próximos se solapaban y en otros se resolvían, con lo cual la utilización de los tiempos de retención como único criterio para la identificación de un componente en una mezcla con elución en gradiente, quedó descartado.

Se definió entonces cada pico cromatográfico a través de su espectro, por comparación con los espectros de 14 patrones puros que formaban la librería y se usó el tiempo de retención para completar los resultados surgidos del análisis de espectros.

Tabla 44. Tiempos de retención de los patrones puros

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Gálico	1.42
p-Hidroxibenzoico	4.54
p-Hidroxibenzaldehído	6.00
Cafeico	6.62
Epicatequina	9.00
p-Cumárico	9.72
Ferúlico	12.57
Delfinidina	16.79
Cianidina	24.64
Miricetina	27.52
Pelargonidina	29.67
Peonidina	31.00
Malvidina	31.67
Kempferol	35.75

CREACIÓN DE LIBRERÍAS

La posibilidad de almacenar los espectros, permitió crear varias librerías que después se usarían con fines identificativos.

Para la obtención de estos espectros fue necesario preparar las disoluciones individuales para los 14 patrones puros de los que se disponía. De cada una de estas disoluciones, se inyectaron 20 μL y se procedió a su elución. Éstas se llevaron a cabo en régimen de gradiente, manteniendo fijas las condiciones que se utilizaron posteriormente para llevar a cabo la separación de los polifenoles (explicadas en las páginas 46-48 y 60).

Una vez obtenido el cromatograma de cada patrón, se procedió a su estudio hasta obtener el espectro de absorbancia utilizando las facilidades de las

que disponía el software del programa. Esto permite seleccionar el tiempo de retención en el máximo del pico y obtener el espectro característico a ese tiempo de retención. Se obtuvieron así los 14 espectros y se editó la librería. A la vista de los máximos espectrales de cada sustancia, se escogieron como longitudes de onda óptimas para llevar a cabo la identificación de cada compuesto, la de 280 nm para polifenoles no flavonoides, epicatequina y kempferol, y la de 525 nm para las antocianinas.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Una vez identificados los polifenoles estudiados, se integró el área de los picos correspondientes. Cada vino se inyectó por duplicado y se calculó el área media. En todos los casos fue necesario diluir las muestras reales, puesto que siempre había algún compuesto cuyo área se encontraba más allá del rango de linealidad establecido. La dilución se llevó a cabo de modo que la concentración de todos los picos estuviera situada dentro del rango de linealidad establecido, y se volvió a inyectar por duplicado cada uno de los vinos diluidos. Se integraron los picos correspondientes y se calculó el área media.

Para los compuestos de los que se disponía de patrones puros, se interpoló el área media en las rectas del rango de linealidad de dichos patrones.

5.2.2– HPLC/MS

La espectrometría de masas es una técnica analítica de carácter destructivo capaz de proporcionar la masa molecular de un compuesto, suministrando además información estructural y cuantitativa.

El acoplamiento del espectrómetro de masas a un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC/MS) por medio de interfases especiales (en nuestro caso electrospray), lo convierten en una poderosa herramienta para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de compuestos en mezclas complejas.

La espectrometría de masas proporciona las masas del ión molecular y de los principales fragmentos del compuesto analizado: cada sustancia presenta una masa determinada y unas fragmentaciones dependientes de su estructura, asimilables a una huella dactilar del compuesto; por tanto, si los espectros son obtenidos bajo unas condiciones determinadas, las “huellas dactilares” pueden ser comparadas y ello permite la identificación de sustancias por comparación de su espectro de masas con aquellos contenidos en bancos de datos.

ANÁLISIS CUALITATIVO

Una vez optimizadas las condiciones de separación óptimas para los patrones, se inyectaron los vinos y se procedió a la identificación de los polifenoles a partir de los espectros de masas de los mismos.

La interpretación de dichos espectros se realizó a partir de las masas obtenidas para el ión molecular y para los principales fragmentos de los compuestos sometidos al análisis.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Después de llevar a cabo la identificación de los polifenoles estudiados se procedió a integrar los picos correspondientes, de forma que se pudiesen calcular, las cantidades de cada compuesto.

Al no disponer de los patrones puros de las antocianinas (debido a que son muy difíciles de obtener por lo que no hay patrones de todas las antocianinas existentes) sino que se tenían los patrones de las antocianidinas, para llevar a cabo la cuantificación de las antocianinas encontradas en los vinos analizados, se utilizaron las rectas de calibrado de los patrones de las antocianidinas que poseían características espectrales y estructurales similares a dichas antocianinas utilizando para ello, un factor de corrección basado en el peso molecular.

El factor de corrección utilizado para el cálculo de las antocianinas se determinó dividiendo el peso molecular del compuesto a ser cuantificado entre el peso molecular del compuesto utilizado como patrón. Chandra y col. [177] justificaron el uso de este factor de corrección calculando las recuperaciones de cantidades conocidas de 3-monoglucósido de cianidina y de 3-monorutinósido de cianidina a partir de sus disoluciones patrón una en relación a la otra a tres diferentes concentraciones a 520 nm. Las recuperaciones de estos dos compuestos se calcularon usando los factores de corrección del peso molecular para rangos específicos de cuantificación y van de 97 a 101%. El uso de factores de corrección del peso molecular fue posteriormente confirmado cuantificando 3-monorutinósido de cianidina en polvo de cereza ácido contra patrón de 3-monorutinósido de cianidina y de 3-monoglucósido de cianidina, por separado. La multiplicación por el factor de corrección del peso molecular se usó en el segundo caso para convertir 3-monorutinósido de cianidina calculado como 3-monoglucósido de cianidina en 3-monorutinósido de cianidina. Los resultados establecieron una correlación directa entre pesos moleculares y respuestas (absorbancia/concentración) entre antocianinas que contienen agliconas similares (antocianidinas).

Este método permite seleccionar un patrón de antocianina externo comercialmente disponible para la cuantificación de antocianinas relacionadas independientemente de su disponibilidad comercial en forma pura. La base de tal selección debería ser su semejanza con las antocianinas presentes en la muestra a ensayar sobre la base de su espectro UV. Esto se puede hacer fácilmente seleccionando un patrón de antocianina disponible comercialmente que tenga una mitad aglicona (antocianidina) similar a las presentes en las antocianinas de la muestra a ensayar. Esto capacitaría, así como justificaría, el uso de factores de corrección del peso molecular para cuantificaciones específicas de antocianinas en las muestras. En esta discusión se establece que este método puede ser aplicado para la verificación y cuantificación de antocianinas individuales y totales, en diversos materiales en bruto de origen botánico que son estandarizados para cantidades específicas de antocianinas.

5.3- MUESTRAS

Para aplicar el método optimizado y puesto a punto a muestras reales, se estudió la composición de distintos vinos tintos comerciales pertenecientes a tres denominaciones de origen (D.O.) gallegas: 31 vinos con D.O. Ribeira Sacra, 14 vinos con D.O. Ribeiro y 16 con D.O. Valdeorras.

Fueron varios los criterios seguidos a la hora de escoger las muestras:

- Se escogieron esas tres D.O. porque son las que producen una mayor cantidad de vinos tintos en Galicia.
- Se escogieron muestras de vinos de tres cosechas diferentes (1999, 2000 y 2001) para estudiar si existe alguna relación entre el año de cosecha y el perfil polifenólico de los vinos analizados.
- Dentro de cada D.O. se estudiaron distintas bodegas y dentro de cada bodega se estudiaron distintas cosechas.

Además hay que señalar que el motivo de que no se tengan el mismo número de muestras para todos los años estudiados es debido a que las muestras analizadas fueron las que se encontraron disponibles en el mercado, es decir, las que llegan al consumidor. Hay que resaltar el bajo número de muestras de la cosecha 1999 para la D.O. Ribeira Sacra, en términos comparativos con respecto a los otros dos años. Como se acaba de citar, el criterio de selección fue un muestreo a través de los establecimientos comerciales en los que están disponibles al público estos vinos. Parece probable que el año del que se trata y el auge paulatino que experimentó en interés de cara al consumidor esta D.O., hayan influido en que inicialmente hubiese menos caldos disponibles, que luego fueron incrementando progresivamente con el tiempo.

En base a todo lo expuesto anteriormente, los vinos analizados para cada una de las D.O. estudiadas se muestran a continuación:

Tabla 45. Vinos con D. O. Ribeira Sacra

Código	Vinos analizados	Cosecha
RS1	Marqués de Garoña	1999
RS2	Vía Romana	1999
RS3	Viña Portotide	1999
RS4	Abadía da Cova Roble	1999
RS5	Cividade	2000
RS6	Don Bernardino	2000
RS7	Rectoral de Amandi	2000
RS8	Viña Portotide	2000
RS9	Don Bernardino (cosecha especial)	2000
RS10	Abadía da Cova Roble	2000
RS11	Viña Vella	2000
RS12	Viña Sancosmede	2000
RS13	Viñal de Diamondi	2000
RS14	Beira	2000
RS15	Viña de Neira	2000
RS16	Val de Quiroga	2000
RS17	Viña Cazoga	2000
RS18	Abadía da Cova	2000
RS19	Ribeira de Valboa	2000
RS20	Ribeira de Pantón	2000
RS21	Pincelo	2000
RS22	Don Darío	2001
RS23	Rectoral de Amandi	2001
RS24	Ribeira de Pantón	2001
RS25	Beira	2001
RS26	Viña Cazoga	2001
RS27	Abadía da Cova	2001
RS28	Cividade	2001
RS29	Vía Romana	2001
RS30	Viña Sancosmede	2001
RS31	Viña de Neira	2001

Tabla 46. Vinos con D. O. Ribeiro

Código	Vinos analizados	Cosecha
R1	Alen da Isteria	1999
R2	Viña do Campo	1999
R3	Eidos Ermos	1999
R4	A Forna dos Pasás	1999
R5	Viña do Campo	2000
R6	O'Ventosela	2000
R7	Soñal	2000
R8	Rey la Fuente	2000
R9	Pazo	2000
R10	A Forna dos Pasás	2000
R11	Pazo	2001
R12	O'Ventosela	2001
R13	Soñal	2001
R14	Alen da Isteria	2001

Tabla 47. Vinos con D. O. Valdeorras

Código	Vinos analizados	Cosecha
V1	Viña Camba	1999
V2	Señorío de Roblido	1999
V3	Mencíño	1999
V4	Odil	1999
V5	Joaquín Rebolledo	1999
V6	Albar	1999
V7	Mencíño	2000
V8	Joaquín Rebolledo	2000
V9	Señorío de Roblido	2000
V10	Pingadelo	2000
V11	Albar	2000
V12	Galiciano	2000
V13	Medulio	2001
V14	Mencíño	2001
V15	Señorío de Roblido	2001
V16	Joaquín Rebolledo	2001

5.4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1- HPLC

Los perfiles cromatográficos que se obtuvieron con las muestras de vino diferían de los que se obtuvieran con los patrones, debido a la ausencia de algún polifenol o a la presencia de otras sustancias para las que no se disponía de patrones. En la Fig. 70 se puede ver el cromatograma del vino Beira 2000 perteneciente a la denominación de origen Ribeira Sacra.

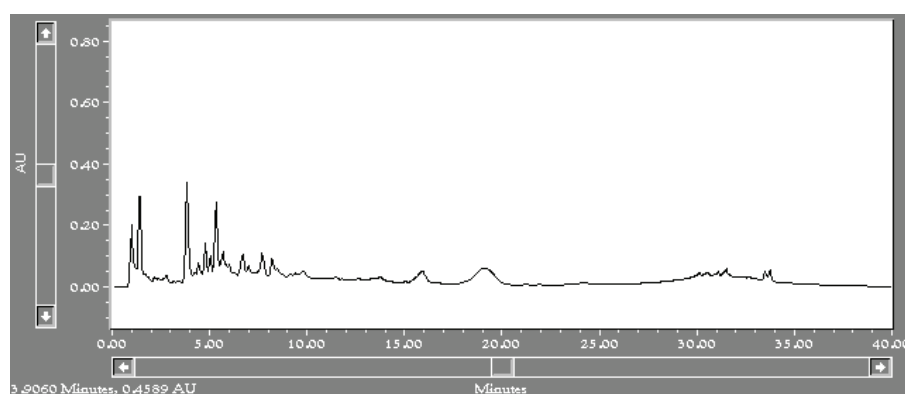


Fig. 70 Cromatograma de un vino analizado por HPLC

En el cromatograma anterior correspondiente al vino Beira 2000 se identificaron los siguientes compuestos: ácido gálico, epicatequina y miricetina.

El motivo por el cual mediante el análisis por HPLC no se identificaron antocianinas fue debido a que en los vinos tintos las antocianinas aparecen glucosiladas bajo la forma de 3-monoglucósidos, y se disponía de los cloruros de las mismas (es decir, de las antocianidinas), por lo que no fue posible a partir de los espectros de los picos de los cromatogramas registrados a 525 nm, diferenciar cuáles eran unas u otras debido a que todas ellas presentan espectros de absorción muy similares y además tampoco se conocían sus tiempos de retención.

Esto no supuso ningún problema ya que se usó el equipo de HPLC/MS como complemento del HPLC y con él sí se pudieron identificar y cuantificar las antocianinas presentes en las muestras de vino analizadas.

Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos identificados teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta el momento fueron:

Tabla 48. Concentraciones de los compuestos polifenólicos en los vinos estudiados

MUESTRA	GÁLICO (ppm)	EPICATEQUINA (ppm)	P-CUMÁRICO (ppm)	CAFEICO (ppm)	FERÚLICO (ppm)	MIRICETINA (ppm)
RS1	90.87	0.00	5.88	0.00	0.00	2.98
RS2	125.01	131.95	0.00	0.00	0.00	0.00
RS3	50.48	61.85	0.00	0.00	0.00	0.00
RS4	236.29	75.05	0.00	0.00	0.00	0.00
RS5	77.56	7.49	0.00	0.00	0.00	15.15
RS6	82.25	44.29	0.00	0.00	0.00	5.96
RS7	73.94	33.02	4.73	0.00	0.00	3.05
RS8	65.97	0.00	0.00	0.00	0.00	4.07
RS9	93.62	107.94	0.00	0.00	0.00	10.20
RS10	144.08	0.00	0.00	0.00	0.00	8.73
RS11	89.64	176.21	0.00	0.00	0.00	4.53
RS12	74.09	117.72	0.00	0.00	0.00	0.00
RS13	72.57	115.56	0.00	0.00	0.00	0.00
RS14	84.91	98.04	0.00	0.00	0.00	2.56
RS15	98.89	51.06	0.00	0.00	0.00	7.41
RS16	80.69	89.20	0.00	0.00	0.00	0.00
RS17	116.17	83.05	0.00	0.00	0.00	0.00
RS18	183.45	95.77	0.00	0.00	0.00	16.28
RS19	48.42	35.13	0.00	0.00	0.00	9.28
RS20	67.53	160.23	0.00	0.00	0.00	0.00
RS21	46.63	0.00	3.60	0.00	0.00	0.00
RS22	90.61	96.57	0.00	0.00	0.00	3.70
RS23	122.65	31.00	6.36	0.00	0.00	8.50
RS24	52.71	61.06	0.00	0.00	0.00	2.23
RS25	95.81	0.00	6.94	0.00	0.00	0.00
RS26	144,83	73.53	7.70	0.00	0.00	0.00
RS27	66,06	27.81	7.19	0.00	0.00	23.47
RS28	46.63	0.00	3.60	0.00	0.00	0.00
RS29	50,28	49.24	0.00	0.00	0.00	1.90
RS30	60,70	37.03	0.00	0.00	0.00	4.13
RS31	52,38	31.35	0.33	0.00	0.00	16.29
R1	67.43	20.15	11.20	38.29	0.00	0.00
R2	70.63	49.22	7.68	0.00	0.00	1.16
R3	135,95	79.72	3.15	0.00	1.13	0.00
R4	115,76	38.20	5.06	0.00	0.58	3.20
R5	75.35	21.95	2.56	0.00	0.00	4.91
R6	56.17	16.39	5.76	21.88	0.00	0.00

MUESTRA	GÁLICO (ppm)	EPICATEQUINA (ppm)	P-CUMÁRICO (ppm)	CAFEICO (ppm)	FERÚLICO (ppm)	MIRICETINA (ppm)
R7	56.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R8	171.10	20.38	0.00	0.00	0.00	0.00
R9	118,11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R10	45,10	165.98	20.43	43.31	0.00	5.03
R11	105.40	101.42	8.97	0.00	0.00	19.80
R12	51.13	8.34	4.71	18.69	0.00	0.00
R13	81.61	63.44	0.00	0.00	0.00	7.79
R14	72.35	0.00	7.28	12.39	0.00	0.00
V1	53.01	30.39	0.00	0.00	0.00	1.32
V2	70.51	67.72	0.00	0.00	0.00	1.25
V3	75.04	49.30	0.00	0.00	0.00	7.08
V4	94.50	121.08	0.00	0.00	0.00	3.97
V5	209.67	42.85	1.29	0.00	0.00	0.00
V6	86.86	13.53	1.77	0.00	0.00	0.00
V7	93.06	71.51	0.00	0.00	0.00	1.09
V8	98.34	72.48	33.81	0.00	0.00	13.23
V9	99.39	57.81	17.54	46.50	0.00	4.92
V10	106.11	120.38	0.00	0.00	0.00	2.45
V11	101.89	52.16	0.00	0.00	0.00	2.79
V12	65.31	14.13	4.94	0.00	0.00	3.69
V13	34.66	11.80	8.36	12.19	0.00	10.81
V14	34.41	51.85	6.21	0.00	0.00	0.00
V15	32.87	43.61	21.70	46.44	0.00	4.22
V16	74.46	44.28	19.25	0.00	0.00	24.09

En las figuras 71-75 se representan gráficamente los histogramas obtenidos para las concentraciones de estos compuestos, a excepción del ácido ferúlico por haberse encontrado solo en dos muestras.

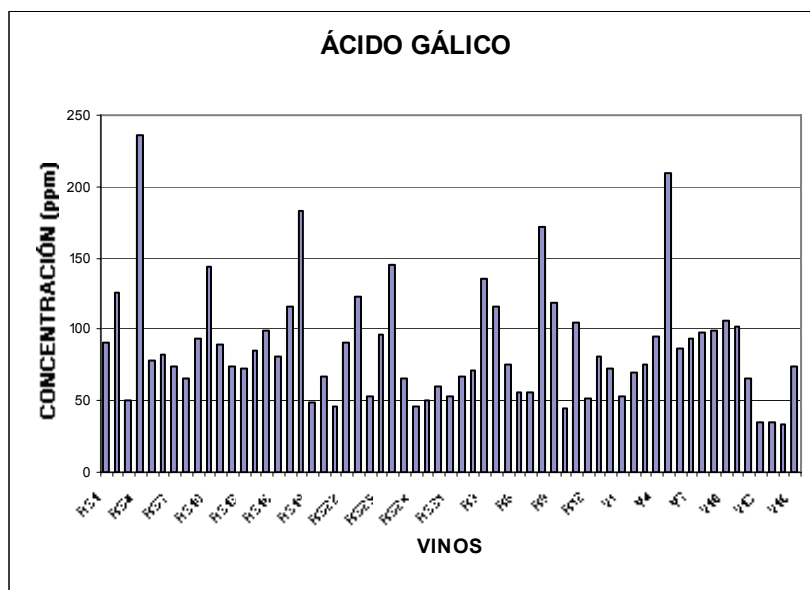


Fig. 71 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de ácido gálico en las muestras estudiadas

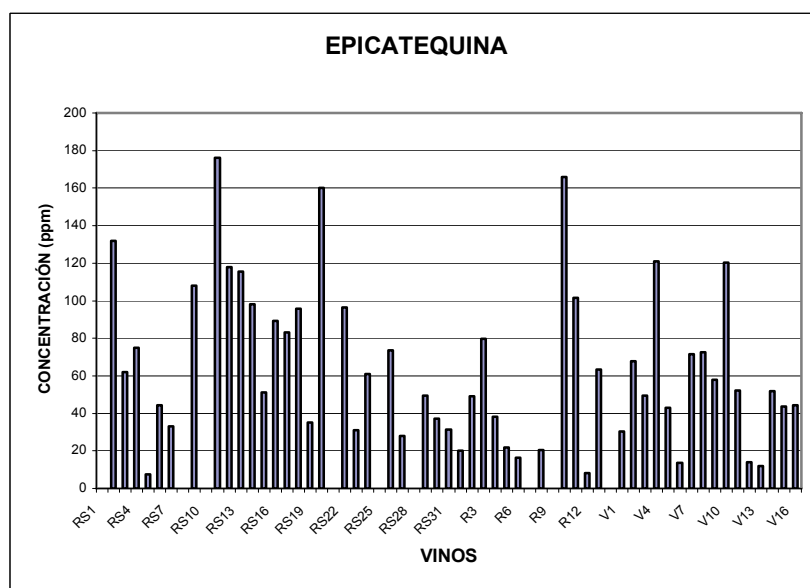


Fig. 72 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de epicatequina en las muestras estudiadas

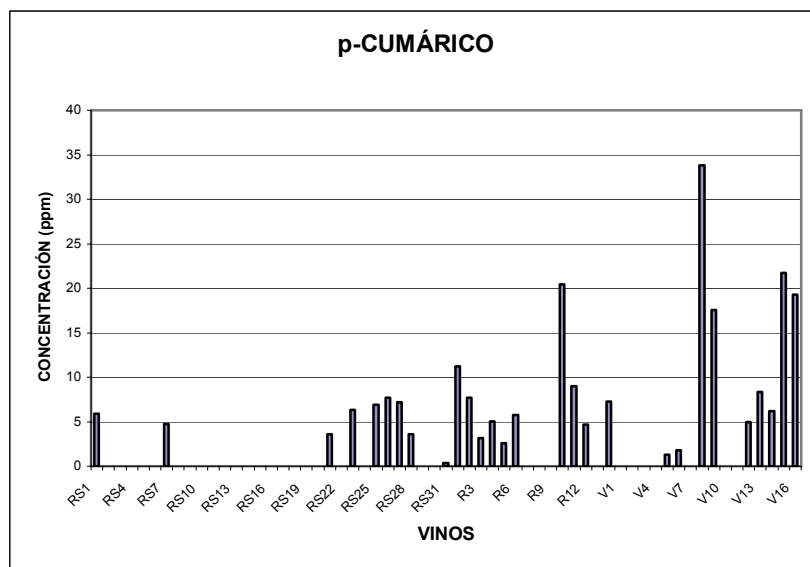


Fig.73 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de ácido *p*-cumárico en las muestras estudiadas

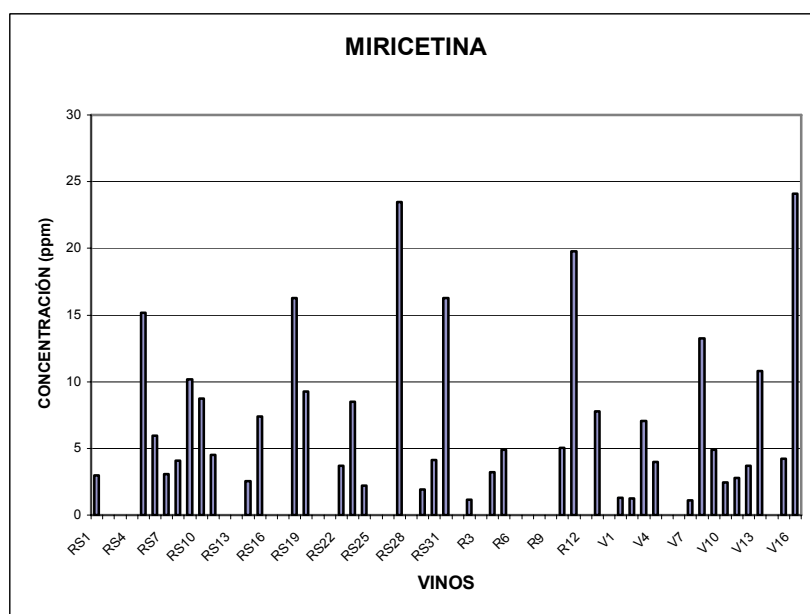


Fig. 74 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de miricetina en las muestras estudiadas

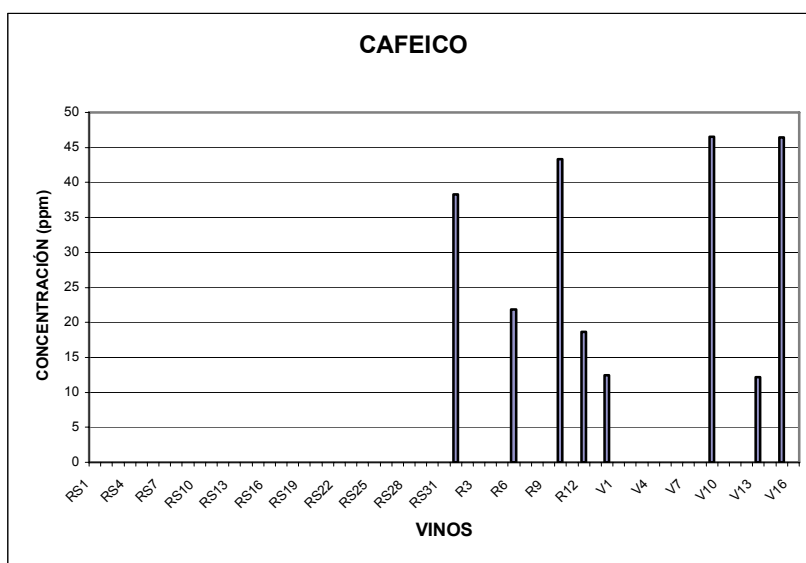


Fig. 75 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de ácido cafeico en las muestras estudiadas

En la tabla 49 se pueden ver los valores promedio, máximo y mínimo obtenidos para cada uno de los polifenoles cuantificados en los vinos tintos analizados para cada una de las tres denominaciones de origen.

Tabla 49. Valores promedio, máximo y mínimo para los polifenoles cuantificados por HPLC

VINOS	VALOR	GÁLICO (ppm)	EPICATEQUINA (ppm)	P-CUMÁRICO (ppm)	CAFEICO (ppm)	FERÚLICO (ppm)	MIRICETINA (ppm)
RS	PROMEDIO	89.86	61.00	1.49	0.00	0.00	4.85
	MÁXIMO	236.29	176.21	7.70	0.00	0.00	23.47
	MÍNIMO	46.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R	PROMEDIO	87.30	41.80	5.49	9.61	0.12	2.99
	MÁXIMO	171.10	165.98	20.43	43.31	1.13	19.80
	MÍNIMO	45.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
V	PROMEDIO	83.13	54.06	7.18	6.57	0.00	5.06
	MÁXIMO	209.67	121.08	33.81	46.50	0.00	24.09
	MÍNIMO	32.87	11.80	0.00	0.00	0.00	0.00

A la vista de estos resultados podemos comentar lo siguiente:

En la tabla 48 (páginas 93 y 94) se observa que mediante el análisis por HPLC, el compuesto polifenólico que aparece mayoritariamente en todos los vinos es el ácido gálico, siendo su concentración media de 89.86 mg/L para los vinos pertenecientes a la Ribeira Sacra, de 87.30 mg/L para los vinos pertenecientes al Ribeiro y de 83.13 mg/L para los pertenecientes a la denominación de origen Valdeorras. La epicatequina ocupa el segundo lugar, ya que aparece en todos los vinos menos en nueve, y aparece con una concentración media de 61.00 mg/L, 41.80 mg/L y de 54.06 mg/L respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios investigadores como Frankel y col. [122] que encontraron que el ácido gálico es uno de los compuestos más abundantes en el vino tinto (65-126 mg/L) ya que proviene de la hidrólisis de los ésteres flavonoides presentes en la piel y en las pepas de las uvas. Estos investigadores también encontraron epicatequina en el vino tinto y en una concentración entre 25-164 mg/L. Arnous y col. [178] analizaron vinos tintos envejecidos y en ellos encontraron ácido gálico con una concentración media de 288.4 mg/L, ácido cafeico con una concentración media de 17.1 mg/L, y ácido cumárico con una concentración media de 12.7 mg/L. También encontraron en todos los vinos analizados ácido caftarico, y ácido sirínico. Burns y col. [133] analizaron 16 vinos tintos comerciales de diferentes países y en ellos encontraron ácido gálico en una concentración entre 45.9 - 416.6 mg/L, epicatequina en una concentración de 17.8 – 173.0 mg/L, ácido cafeico en una concentración de 6.6 - 106.4 mg/L y ácido cumárico en una concentración de 14.7 a 210.6 mg/L. También encontraron otros polifenoles como (+)-catequina, ácido cutárico y ácido caftarico. Salagoity y col. [179] analizaron vinos tintos jóvenes de diferentes variedades de uvas (Cabernet Sauvignon, Merlot y Malbec) y en todos ellos encontraron ácido gálico, ácido cafeico, ácido cumárico, miricetina, ácido ferúlico, ácido sirínico, epicatequina y catequina.

El compuesto que aparece en menor concentración (sin tener en cuenta el ferúlico que sólo aparece en la D.O. Ribeiro y en una concentración media de 0.12 ppm) es la miricetina tanto para los vinos pertenecientes a Ribeiro como a Valdeorras, con una concentración media respectiva de 2.99 mg/L y de 5.06 mg/L. Kallithraka y col. [180] analizaron 20 vinos tintos griegos y encontraron en ellos miricetina en una concentración media de 5.4 mg/L. Estos autores también encontraron en estos vinos la procianidina B1 y B2. En los vinos de la Ribeira Sacra no aparece en ninguno de los vinos analizados ácido cafeico y la miricetina se halla en mayor concentración que el ácido p-cumárico, al contrario de lo que ocurre en las otras dos denominaciones de origen estudiadas.

5.4.2- HPLC/MS

Aquí también los perfiles cromatográficos que se obtuvieron de las muestras de vino diferían de los obtenidos con los patrones, debido también a que en las muestras reales de vino no se encuentran algunos de los polifenoles estudiados y aparacen otros compuestos polifenólicos de los que no se disponía de patrón. En la Fig. 76 se puede ver el espectro de masas obtenido para el vino tinto analizado Beira 2001 perteneciente a la denominación de origen Ribeira Sacra.

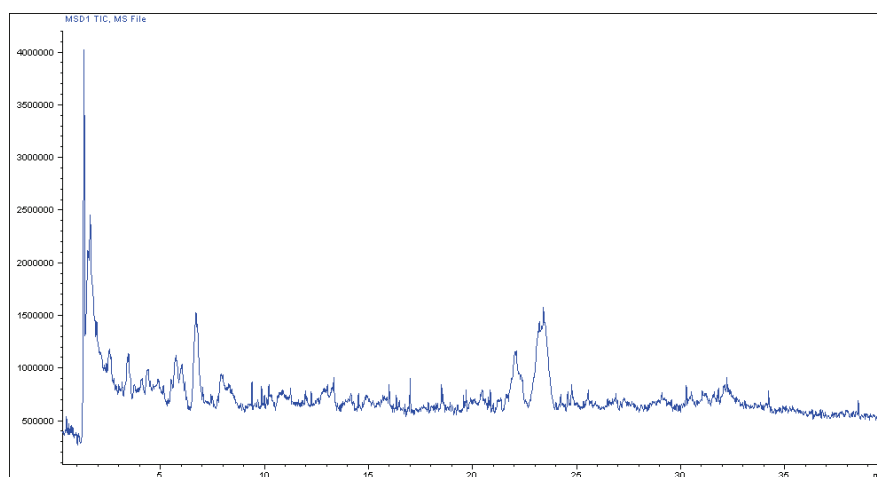


Fig. 76 Espectro de masas del vino Beira 2001

En el espectro de masas anterior correspondiente al vino Beira 2001 se identificaron los siguientes compuestos: 3-monoglucósido de delfinidina, 3-monoglucósido de cianidina, 3-monoglucósido de petunidina, 3-monoglucósido de peonidina, 3-monoglucósido de malvidina, acetato del 3-monoglucósido de peonidina, acetato del 3-monoglucósido de malvidina y p-cumarato del 3-monoglucósido de malvidina.

Los derivados de los 3-monoglucósidos de las distintas antocianinas fueron identificados fácilmente ya que el espectro de masas mostraba una señal correspondiente al ión molecular $[M+H]^+$ y otro fragmento resultante de la pérdida de un azúcar (glucosa) $[(M+H)-162]^+$. Así por ejemplo, el espectro de masas del 3-monoglucósido de malvidina (Fig. 77) muestra el $[M+H]^+ = 493$ y el fragmento $[(M+H)-162]^+ = 331$ que se corresponde con la pérdida de una molécula de glucosa. Los

restantes 3-monoglucósidos para las distintas antocianinas mostraron similares modelos de fragmentación.

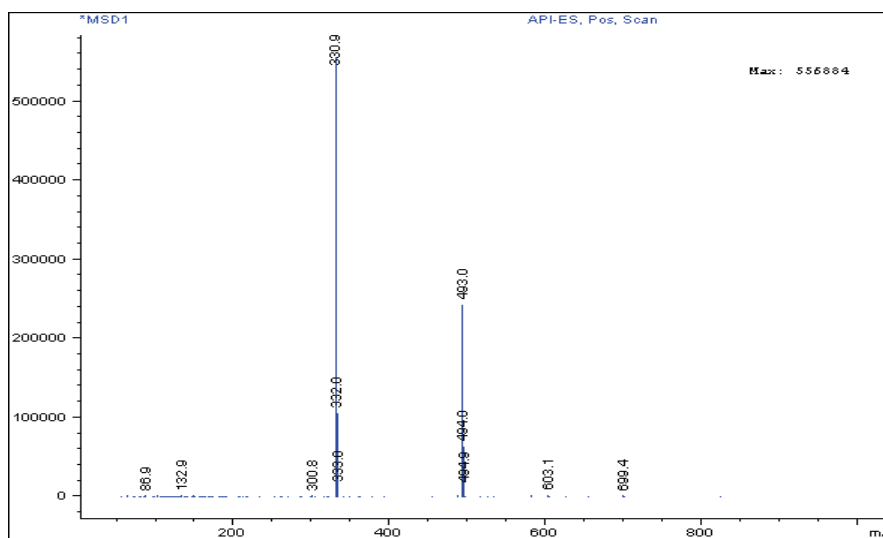


Fig. 77 Espectro de masas del 3-monoglucósido de malvidina

Los espectros de masas de los acetatos de los 3-monoglucósidos de las distintas antocianinas poseían también dos señales características: una de ellas correspondiente al ión molecular $[(M+H)]^+$ y la otra al fragmento $[(M+H)-204]^+$. El valor 204 corresponde al “acetilglucósido”. Por ejemplo, el espectro de masas del acetato del 3-monoglucósido de malvidina (Fig. 78) muestra el $[(M+H)]^+ = 535$ y el fragmento $[(M+H)-204]^+ = 331$ correspondiente a la pérdida del acetilglucósido.

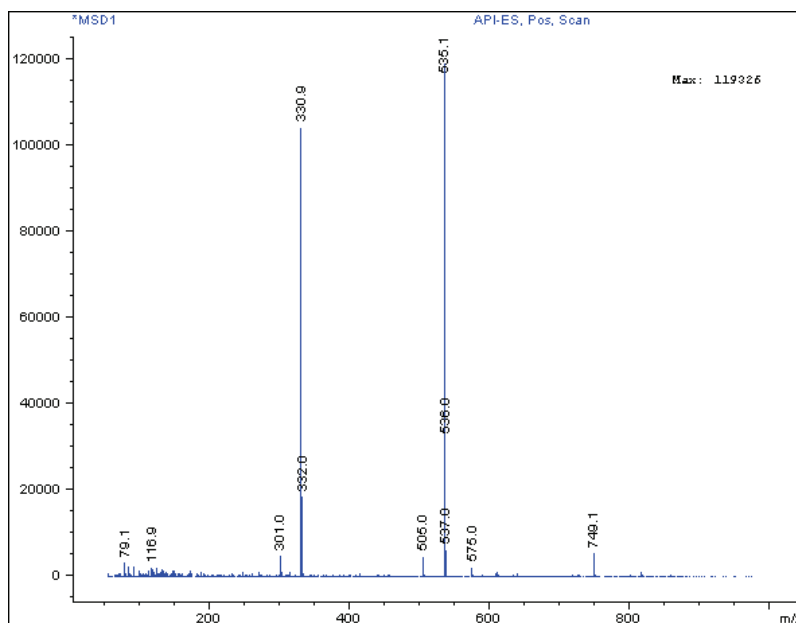


Fig. 78 Espectro de masas del acetato del 3-monoglucósido de malvidina

Los p-cumaratos de los 3-monoglucósidos de las distintas antocianinas fueron identificados ya que sus espectros de masas poseían también dos fragmentos mayoritarios, uno correspondiente al ión molecular $[(M+H)]^+$ y el otro fragmento $[(M+H)-308]^+$ resultante de la pérdida de una molécula de glucosa unida a una molécula de ácido p-cumárico. En la Fig. 79 se muestra a modo de ejemplo el caso del p-cumarato del 3-monoglucósido de malvidina, donde aparece el ión molecular $[(M+H)]^+$ de masa 535.1 y el fragmento $[(M+H)-308]^+$ correspondiente a la masa 330.9.

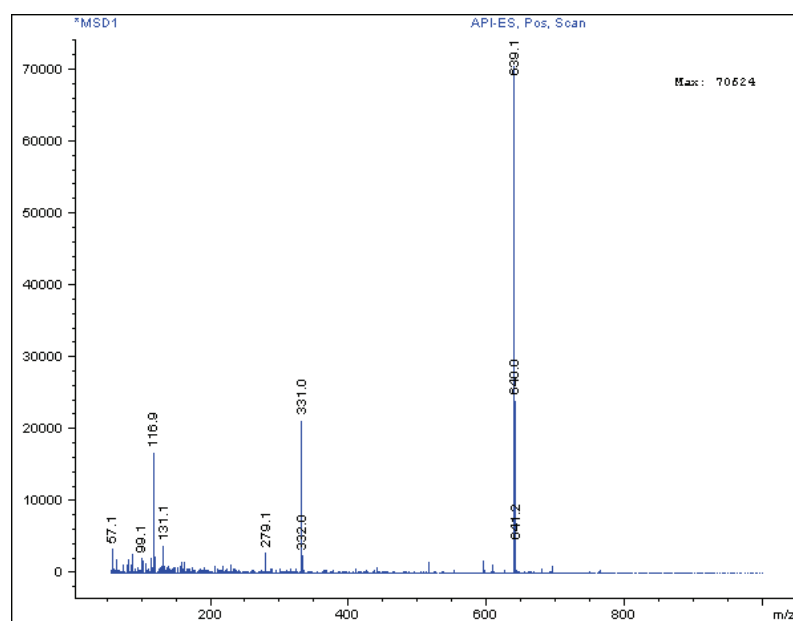


Fig. 79 Espectro de masas del p-cumarato del 3-monoglucósido de malvidina

Para calcular la concentración de las antocianinas identificadas en las muestras de vino estudiadas, se utilizó el factor de corrección basado en el peso molecular mencionado en las páginas 88 y 89 de este trabajo [177]. El patrón utilizado para cuantificar las antocianinas identificadas fue el correspondiente a su respectiva antocianidina, excepto para el caso de los derivados de petunidina de los que no se disponía de dicho patrón por lo que se utilizó el de la antocianidina más parecida a ella estructuralmente. Por tanto, los patrones escogidos para el cálculo de las concentraciones de las antocianinas en cada uno de los vinos analizados fueron los siguientes:

Tabla 50. Patrones utilizados para el cálculo de las concentraciones

COMPUESTO	PATRÓN UTILIZADO
3- monoglucósido de delphinidina	cloruro de delphinidina
3- monoglucosido de cianidina	cloruro de cianidina
3- monoglucósido de petunidina	cloruro de peonidina
3- monoglucósido de peonidina	cloruro de peonidina
3- monoglucósido de malvidina	cloruro de malvidina
acetato del 3- monoglucósido de petunidina	cloruro de peonidina
acetato del 3- monoglucósido de peonidina	cloruro de peonidina
acetato del 3- monoglucósido de malvidina	cloruro de malvidina
p-cumarato del 3- monoglucósido de peonidina	cloruro de peonidina
p-cumarato del 3- monoglucósido de malvidina	cloruro de malvidina

Los resultados obtenidos para cada una de las antocianinas cuantificadas teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente se muestran en la tablas 51-53:

Tabla 51. Concentraciones de las antocianinas en los vinos estudiados

MUESTRA	3-MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE CIANIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
RS1	0.25	0.00	0.00	0.31
RS2	4.78	0.00	5.72	7.67
RS3	0.00	0.00	0.75	2.72
RS4	2.04	0.00	4.45	5.98
RS5	6.19	0.00	10.71	10.94
RS6	8.01	6.86	10.19	9.47
RS7	0.00	0.00	1.25	2.41
RS8	0.00	0.00	8.81	19.46
RS9	11.51	3.06	10.14	10.16
RS10	12.05	0.00	10.62	16.46
RS11	3.91	0.00	5.43	7.87
RS12	5.16	0.00	7.55	6.88
RS13	3.44	0.00	6.78	14.33
RS14	4.17	1.13	6.16	10.52
RS15	7.97	6.82	12.22	9.94
RS16	10.05	0.00	11.57	21.16
RS17	0.00	0.00	2.67	3.70
RS18	7.49	1.52	10.36	11.26
RS19	5.63	0.00	5.05	7.41
RS20	1.12	0.00	1.44	5.33
RS21	2.39	1.52	2.05	6.93
RS22	9.33	4.00	12.39	25.80
RS23	16.87	0.00	16.66	16.48
RS24	6.11	1.61	7.60	20.39
RS25	2.26	0.63	3.23	8.62
RS26	3.88	0.00	6.51	8.51
RS27	7.96	3.01	11.60	13.41
RS28	5.48	0.00	3.31	2.93
RS29	3.61	*	5.94	9.43
RS30	1.74	0.00	0.00	3.32
RS31	9.42	0.00	12.02	11.20
R1	0.36	0.00	1.08	2.44

MUESTRA	3-MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE CIANIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
R2	0.00	0.00	0.23	0.35
R3	0.40	0.00	0.89	2.35
R4	0.88	0.00	1.23	1.82
R5	3.44	0.00	4.19	3.58
R6	1.07	0.00	1.95	3.81
R7	5.84	1.96	9.70	21.83
R8	9.13	7.83	9.44	20.64
R9	4.13	2.27	6.08	18.93
R10	8.50	0.00	9.91	11.55
R11	13.78	3.45	16.71	55.14
R12	3.46	0.71	4.24	18.31
R13	4.14	0.00	5.80	20.03
R14	12.89	4.71	17.51	23.00
V1	0.00	0.00	0.00	1.32
V2	1.39	0.54	2.23	9.65
V3	0.29	0.00	0.50	1.19
V4	0.86	0.00	0.94	2.58
V5	0.00	0.00	0.00	0.27
V6	0.00	0.00	0.00	1.72
V7	0.98	0.00	1.61	1.94
V8	4.95	0.54	6.25	4.35
V9	9.42	0.00	16.85	27.10
V10	2.54	0.16	3.63	7.18
V11	1.03	0.13	2.50	7.99
V12	5.82	0.00	9.78	6.25
V13	5.57	0.00	8.65	12.70
V14	5.67	1.54	9.06	8.84
V15	10.61	3.89	18.97	42.29
V16	6.56	1.09	9.47	8.57

*: pico no cuantificable

Tabla 52

MUESTRA	3-	ACETATO	ACETATO	ACETATO
	MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
RS1	0.00	0.00	0.00	0.00
RS2	22.86	0.00	1.39	1.80
RS3	9.28	0.00	0.00	0.16
RS4	38.83	0.00	0.00	3.25
RS5	119.15	0.00	0.00	6.66
RS6	109.37	1.67	1.85	3.95
RS7	12.39	0.00	0.00	0.00
RS8	65.63	0.00	0.00	0.00
RS9	112.58	5.27	6.91	5.03
RS10	138.29	9.34	0.00	16.09
RS11	57.33	0.42	1.02	1.76
RS12	63.86	2.32	2.48	5.34
RS13	41.47	0.00	3.26	1.07
RS14	36.76	3.44	2.94	2.82
RS15	158.89	0.00	0.00	5.48
RS16	88.42	0.00	0.00	4.12
RS17	31.03	0.00	0.00	1.10
RS18	96.70	3.59	0.00	4.90
RS19	33.04	0.00	0.00	3.66
RS20	18.18	0.00	0.00	0.82
RS21	53.60	2.55	0.00	5.62
RS22	118.56	3.38	0.00	7.57
RS23	102.83	0.00	11.32	8.15
RS24	55.93	0.00	0.00	5.53
RS25	43.64	0.00	0.00	1.00
RS26	71.03	0.00	0.00	5.00
RS27	111.29	3.10	4.89	6.28
RS28	61.13	0.00	0.00	1.77
RS29	62.13	0.00	0.00	*
RS30	39.74	0.00	0.00	0.00
RS31	96.25	0.00	11.80	5.07
R1	10.63	0.00	0.00	0.00
R2	2.28	0.00	0.00	0.21
R3	12.59	0.00	0.00	0.77

MUESTRA	3-	ACETATO	ACETATO	ACETATO
	MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
R4	13.86	0.00	0.00	0.50
R5	49.93	0.00	0.00	0.00
R6	11.93	0.00	0.00	0.10
R7	56.10	0.00	0.00	4.08
R8	85.63	0.00	5.10	4.93
R9	49.91	0.00	0.00	3.08
R10	47.81	0.00	0.00	4.11
R11	145.12	0.00	0.00	0.00
R12	57.97	0.00	0.00	1.81
R13	41.17	0.00	0.00	1.15
R14	83.46	0.00	0.00	9.05
V1	0.00	0.00	0.00	1.27
V2	25.19	0.00	0.00	0.33
V3	7.98	0.00	0.02	0.25
V4	11.63	0.00	0.00	0.05
V5	2.18	0.00	0.00	0.00
V6	5.66	0.53	0.00	0.16
V7	21.26	0.01	0.00	0.71
V8	66.64	1.23	0.00	2.38
V9	70.60	11.42	2.25	15.24
V10	44.90	2.36	0.00	3.57
V11	32.75	0.06	0.00	1.27
V12	76.39	2.63	0.00	4.44
V13	140.51	2.08	4.40	5.19
V14	96.15	0.00	0.00	4.83
V15	121.85	0.00	8.36	14.53
V16	97.98	8.16	0.00	2.57

Tabla 53

MUESTRA	ACETATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	CUMARATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)	CUMARATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)
RS1	0.69	0.00	0.00
RS2	1.73	0.35	0.64
RS3	0.70	0.25	0.21
RS4	10.36	0.56	0.90
RS5	26.20	0.00	0.00
RS6	18.90	0.00	0.00
RS7	10.75	0.00	0.00
RS8	0.00	0.00	13.79
RS9	11.70	0.00	0.00
RS10	30.15	0.00	0.00
RS11	6.12	0.00	2.14
RS12	17.85	0.00	0.75
RS13	2.55	0.22	0.00
RS14	4.95	0.00	0.00
RS15	33.83	0.00	25.83
RS16	15.00	1.90	0.47
RS17	3.37	0.00	0.00
RS18	22.95	0.00	0.00
RS19	7.28	0.00	0.00
RS20	2.17	0.00	0.41
RS21	9.73	2.41	2.68
RS22	24.55	0.46	0.84
RS23	24.04	10.04	26.11
RS24	9.81	5.43	9.17
RS25	5.10	0.00	0.62
RS26	14.26	1.27	1.40
RS27	22.56	3.58	7.61
RS28	12.12	3.82	5.11
RS29	7.58	2.08	7.67
RS30	4.62	1.50	3.52
RS31	23.86	4.86	17.09
R1	0.00	0.00	0.00
R2	0.18	0.40	0.15
1R3	2.71	0.80	0.33

MUESTRA	ACETATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	CUMARATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)	CUMARATO 3-MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)
R4	2.28	0.93	0.94
R5	13.44	0.00	6.15
R6	0.40	0.00	0.00
R7	6.78	1.95	0.00
R8	15.48	9.04	2.04
R9	3.86	1.77	0.61
R10	8.11	0.00	0.00
R11	28.14	15.63	25.69
R12	2.59	0.00	0.00
R13	1.02	0.00	0.00
R14	20.34	4.27	9.77
V1	0.00	0.00	0.00
V2	1.77	3.55	1.64
V3	0.62	0.00	0.00
V4	0.93	0.00	1.68
V5	0.00	0.00	0.00
V6	0.25	0.21	0.52
V7	3.73	0.00	0.00
V8	12.77	0.00	0.00
V9	20.56	15.34	17.69
V10	7.62	0.00	0.00
V11	1.57	0.82	0.00
V12	16.71	0.20	2.79
V13	28.48	2.64	12.87
V14	18.70	0.00	6.82
V15	21.80	19.34	38.09
V16	17.18	2.09	8.12

En las figuras 80-90 se representan gráficamente los valores obtenidos para las concentraciones de estos compuestos.

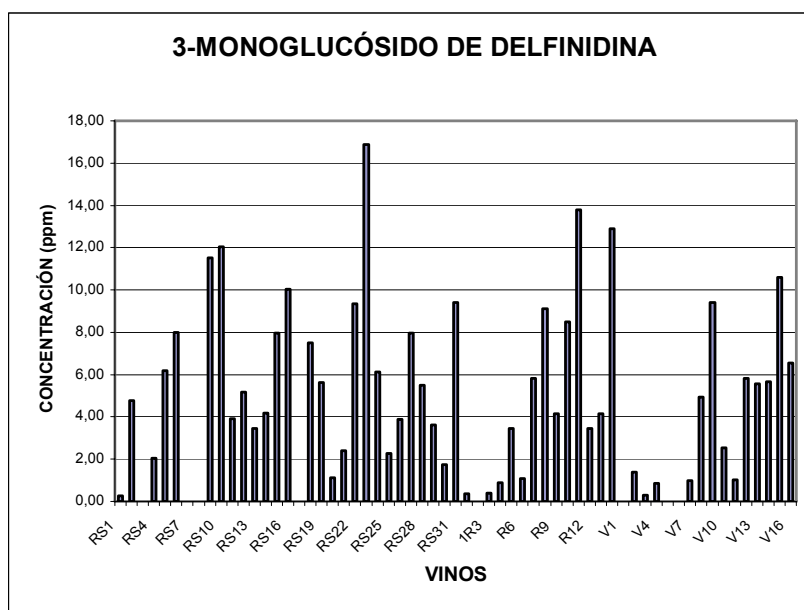


Fig.80 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de 3-monoglucósido de delphinidina en las muestras estudiadas

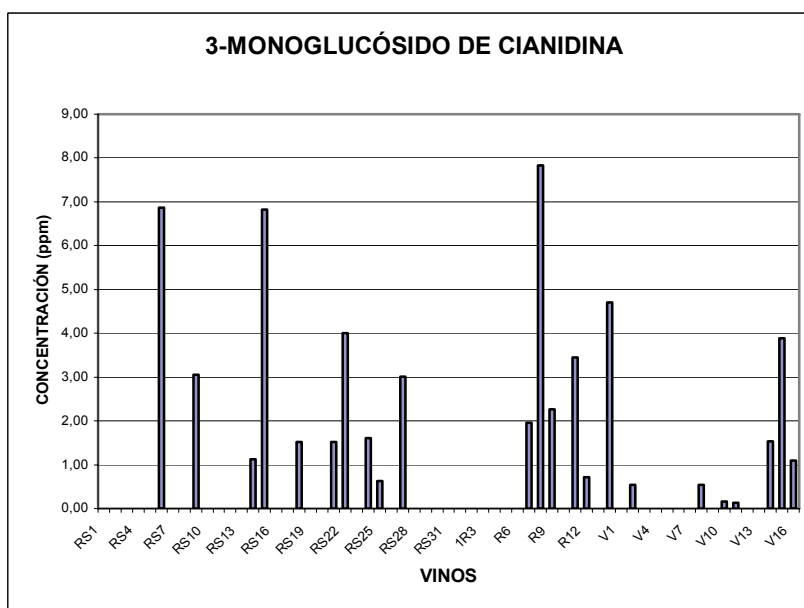


Fig.81 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de 3-monoglucósido de cianidina en las muestras estudiadas

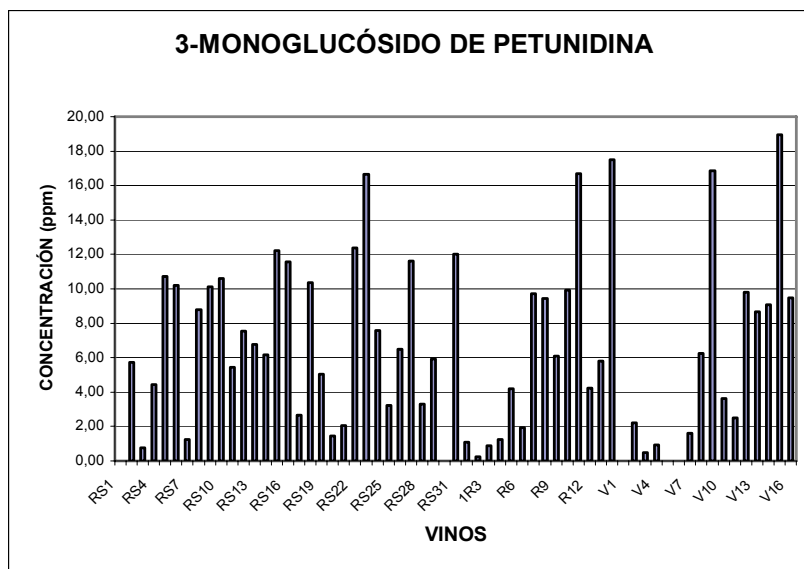


Fig 82 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de 3-monoglucósido de petunidina en las muestras estudiadas

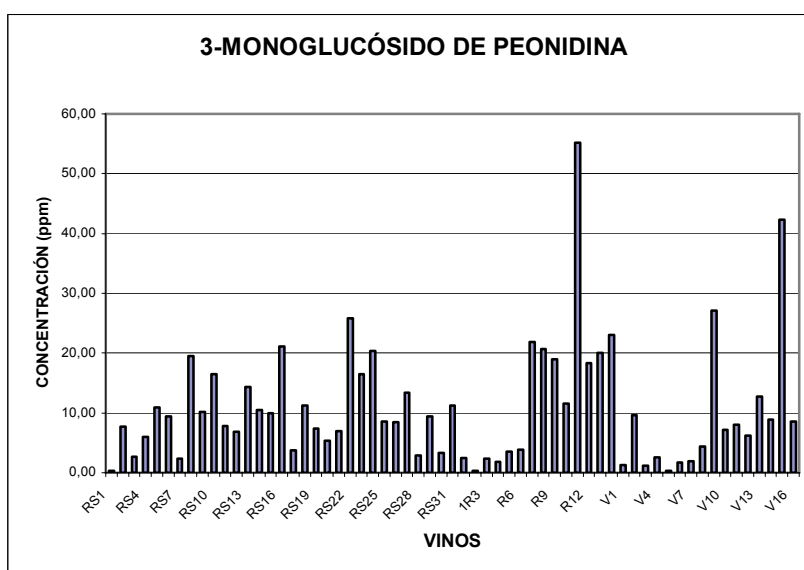


Fig. 83 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de 3-monoglucósido de peonidina en las muestras estudiadas

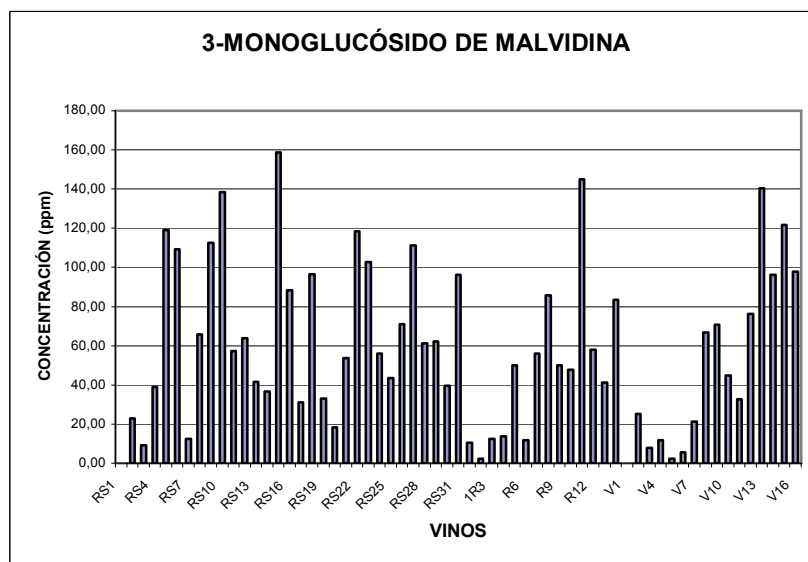


Fig.84 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración de 3-monoglucósido de malvidina en las muestras estudiadas

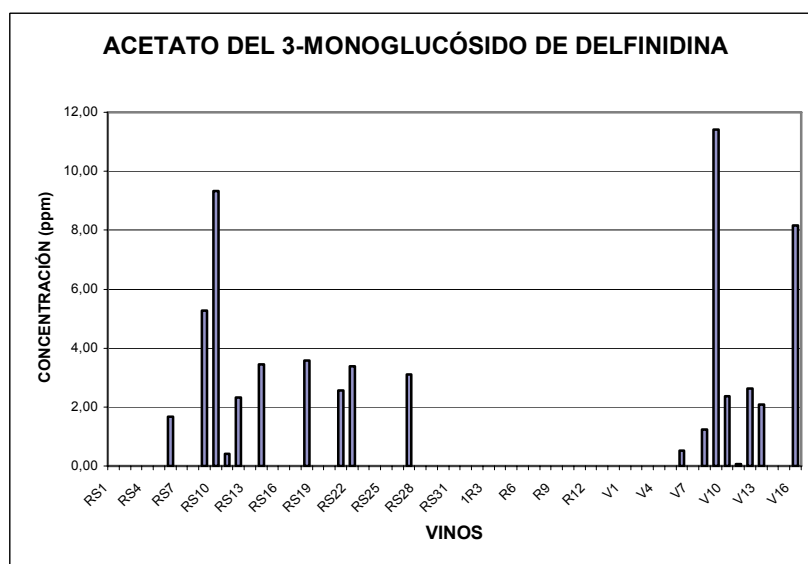


Fig.85 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del acetato 3-monoglucósido de delphinidina en las muestras estudiadas

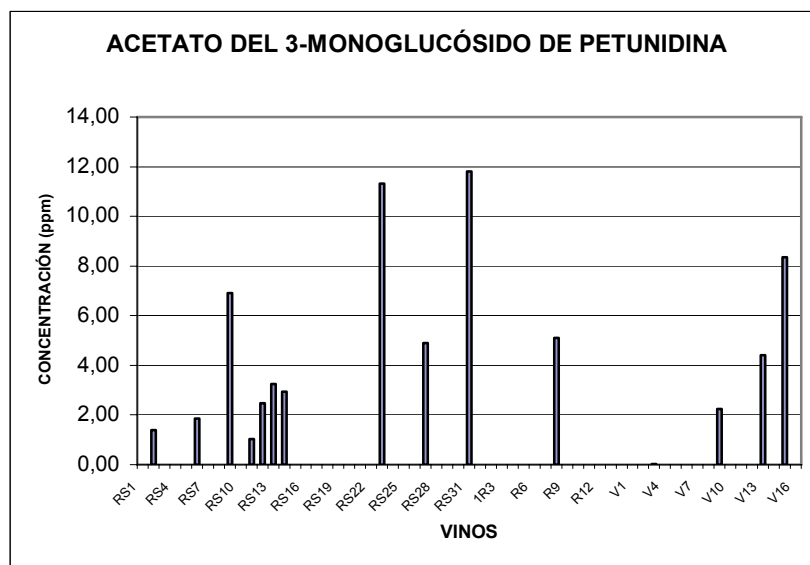


Fig.86 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del acetato 3-monoglucósido de petunidina en las muestras estudiadas

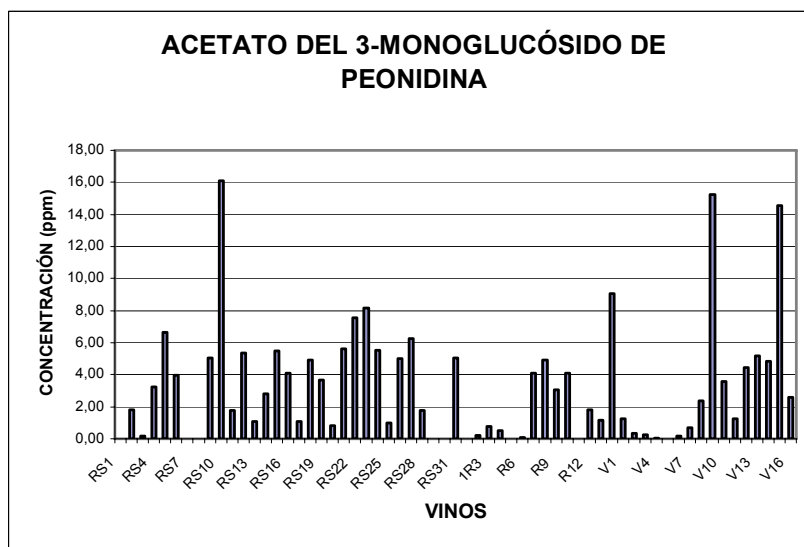


Fig.87 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del acetato 3-monoglucósido de peonidina en las muestras estudiadas

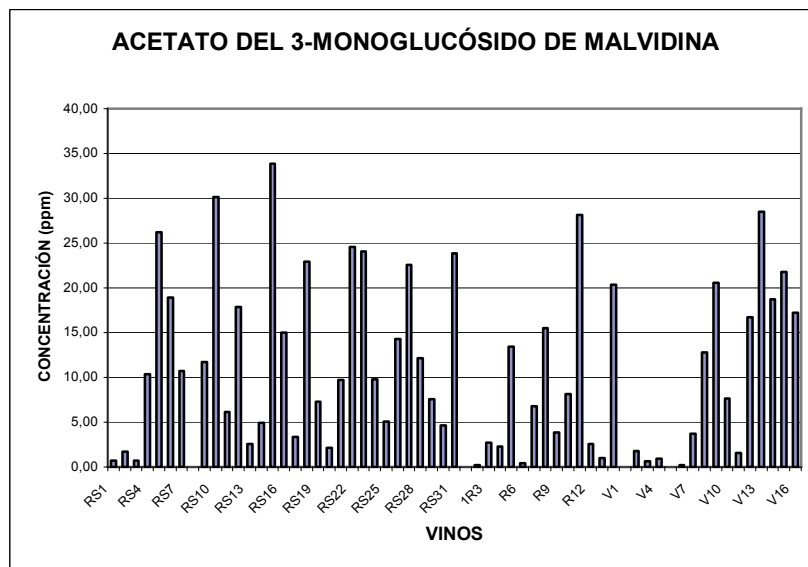


Fig.88 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del acetato 3-monoglucósido de malvidina en las muestras estudiadas

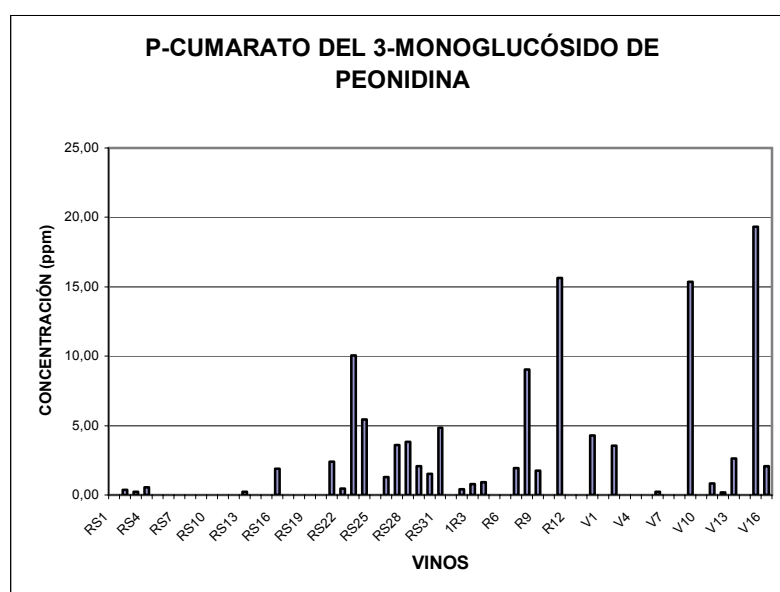


Fig.89 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del p-cumarato del 3-monoglucósido de peonidina en las muestras estudiadas

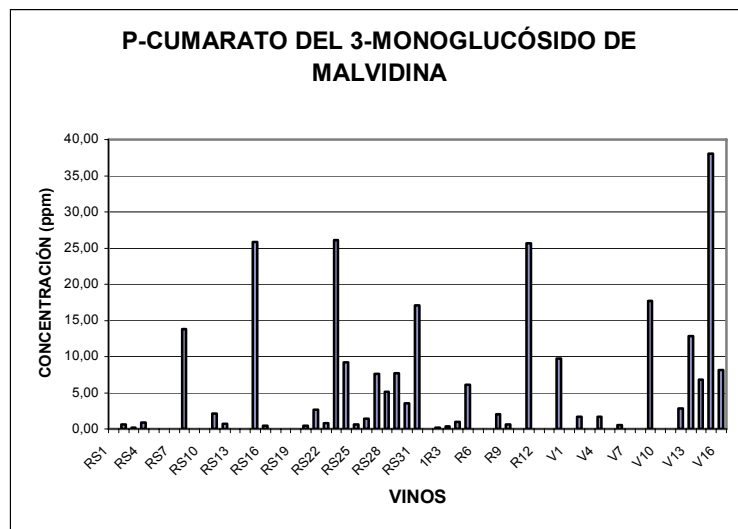


Fig.90 Representación gráfica de los valores obtenidos para la concentración del p-cumarato del 3-monoglucósido de malvidina en las muestras estudiadas

En la tabla 54 se pueden ver los valores promedio, máximo y mínimo obtenidos para cada una de las antocianinas cuantificadas en los vinos tintos analizados para cada una de las tres denominaciones de origen.

Tabla 54. Valores promedio, máximo y mínimo para las antocianinas cuantificadas por HPLC/MS

VINOS	VALOR	3-	3-	3-	3-
		MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE CIANIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
RS	PROMEDIO	5.25	1.01	6.88	10.03
	MÁXIMO	16.87	6.86	16.66	25.80
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00	0.31
R	PROMEDIO	4.86	1.50	6.35	14.56
	MÁXIMO	13.78	7.83	17.51	55.14
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.23	0.35
V	PROMEDIO	3.48	0.49	5.65	9.00
	MÁXIMO	10.61	3.89	18.97	42.29
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00	0.27

VINOS	VALOR	3-	ACETATO 3-	ACETATO 3-	ACETATO 3-
		MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE DELFINIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE PETUNIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)
RS	PROMEDIO	66.78	1.13	1.54	3.80
	MÁXIMO	158.89	9.34	11.80	16.09
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00	0.00
R	PROMEDIO	47.74	0.00	0.36	2.13
	MÁXIMO	145.12	0.00	5.10	9.05
	MÍNIMO	2.28	0.00	0.00	0.00
V	PROMEDIO	51.35	1.78	0.94	3.55
	MÁXIMO	140.51	11.42	8.36	15.24
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00	0.00

VINOS	VALOR	ACETATO 3-	CUMARATO 3-	CUMARATO 3-
		MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE PEONIDINA (ppm)	MONOGLUCÓSIDO DE MALVIDINA (ppm)
RS	PROMEDIO	12.43	1.25	4.10
	MÁXIMO	33.83	10.04	26.11
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00
R	PROMEDIO	7.52	2.49	3.26
	MÁXIMO	28.14	15.63	25.69
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00
V	PROMEDIO	9.54	2.76	5.64
	MÁXIMO	28.48	19.34	38.09
	MÍNIMO	0.00	0.00	0.00

A la vista de estos resultados podemos hacer las siguientes consideraciones:

Como se puede observar en las tablas 51-53 (páginas 103-108), en el análisis por HPLC/MS la antocianina encontrada en mayor cantidad en los vinos analizados pertenecientes a las tres denominaciones de origen estudiadas es el 3-monoglucósido de malvidina, como sucede con la mayoría de variedades de vino de mesa y en los vinos pertenecientes al género *Vitis* [181], siendo su concentración media mayor en la denominación de origen Ribeira Sacra con un valor de 66.78 mg/L. Para esta denominación de origen la segunda antocianina más abundante es el acetato-3-monoglucósido de malvidina, seguida muy de cerca por el 3-monoglucósido de peonidina. En los vinos pertenecientes a la denominación de origen Valdeorras también ocurre esto mientras que en los Ribeiro el 3-monoglucósido de peonidina aparece con una concentración media mayor que el acetato-3-monoglucósido de malvidina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores como Hebrero y col. [158], que encontraron que en vinos tintos de la variedad Tempranillo, el compuesto que aparece en mayor cantidad es el 3-monoglucósido de malvidina, seguido en este caso por el 3-monoglucósido de delfinidina y el 3-monoglucósido de peonidina. Bakker y col. [151] analizaron vinos tintos jóvenes y también encontraron como antocianina más abundante el 3-monoglucósido de malvidina con una concentración media de 127.4 mg/L, seguida del acetato-3-monoglucósido de malvidina con una concentración media de 39.4 mg/L. Arnous y col. [178] en los vinos tintos que analizaron también encontraron como antocianina mayoritaria el 3-monoglucósido de malvidina con una concentración media de 42.2 mg/L.

Para las denominaciones de origen Ribeira Sacra y Valdeorras la antocianina que aparece en menor cantidad es el 3-monoglucósido de cianidina, mientras que en la denominación de origen Ribeiro no aparece el acetato-3-monoglucósido de delfinidina, que sí aparece en las otras dos denominaciones de origen estudiadas, y la antocianina siguiente en aparecer en menor concentración es el acetato-3-monoglucósido de petunidina (encontrándose en menor cantidad que el 3-monoglucósido de cianidina).

En las figuras 91-93 se pueden ver las proporciones relativas de antocianos no acilados y acilados (derivados acetilados y p-cumarilados) presentes en los vinos analizados para las tres denominaciones de origen estudiadas.

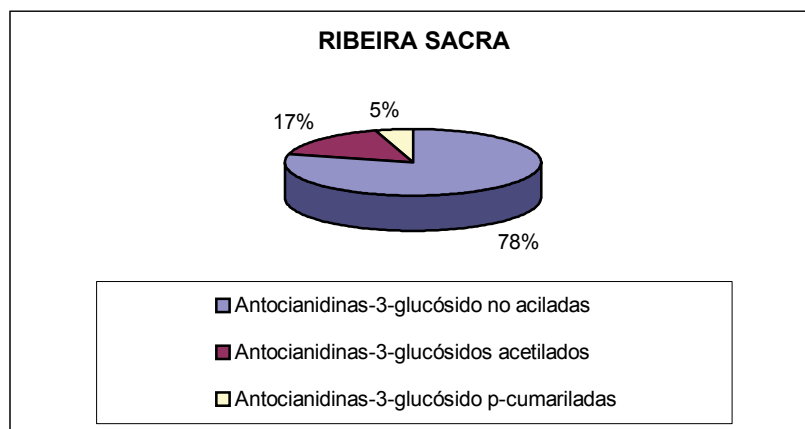


Fig. 91 *Proporciones relativas de antocianos acilados y no acilados encontrados en los vinos pertenecientes a la denominación de origen Ribeira Sacra*

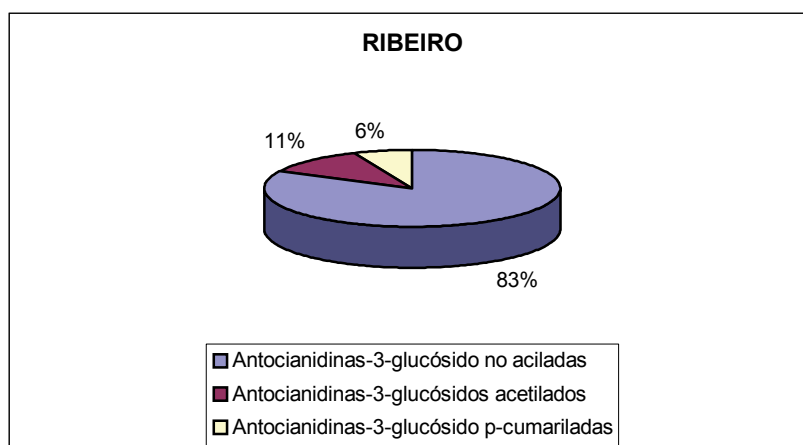


Fig. 92 *Proporciones relativas de antocianos acilados y no acilados encontrados en los vinos pertenecientes a la denominación de origen Ribeiro*

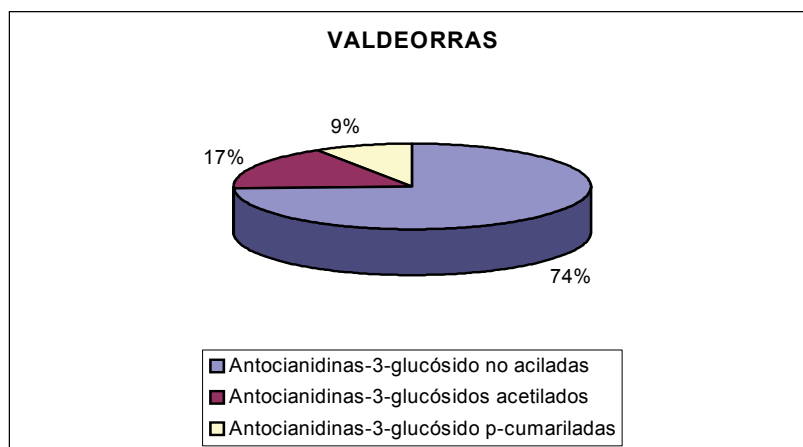


Fig. 93 *Proporciones relativas de antocianos acilados y no acilados encontrados en los vinos pertenecientes a la denominación de origen Valdeorras*

Como se puede observar en las figuras anteriores, para las tres denominaciones de origen estudiadas, los derivados acilados que aparecen en mayor cantidad son los derivados acetilados. El porcentaje de acilación es similar para las tres denominaciones de origen, siendo mayor para la de Valdeorras (un 26% de antocianinas aciladas entre derivadas acetiladas y p-cumariladas), seguida de la D.O. Riberira Sacra con un porcentaje de acilación del 22% y por último sería la D.O. de Ribeiro con porcentaje de acilación del 17%.

5.4.3- IDENTIFICACIÓN DE OTROS POLIFENOLES

HPLC

Además de establecer los niveles de concentración de los polifenoles de los que se disponía de patrón, se trató de identificar otros polifenoles. Para llevar a cabo estas asignaciones se recurrió a la bibliografía disponible, [182, 183] y además se tuvo en cuenta que [184]:

- Los ácidos cinámicos se retienen mucho más que los ácidos benzoicos correspondientes, debido a que los ácidos cinámicos poseen una cadena etilénica adicional en el anillo bencénico que provoca una mayor retención.
- Entre los ácidos fenólicos se retienen poco los que poseen un mayor número de oxhidrilos sustituidos en el anillo bencénico puesto que son los más polares (por ejemplo el ácido gálico), y por tanto menos afines a la fase estacionaria.

- Los máximos de absorción del espectro de las antocianinas (alrededor de los 280 nm y 525 nm) pueden variar dependiendo de los otros compuestos presentes y del medio.
- Una de las características que permite diferenciar entre un 3-monoglucósido y el correspondiente 3,5-diglucósido es que el primero muestra un hombro alrededor de los 440nm.
- Es posible que las antocianinas se encuentren aciladas con ácido cumárico, cafeico y acético. La acilación implica una pérdida de polaridad con respecto a las antocianinas no aciladas, pérdida de polaridad que es mayor en los cumaratos y cafeoratos que en los acetatos. Todo esto lleva a un aumento de los tiempos de retención.
- Las propiedades espectrales de los cumaratos y cafeoratos de los 3-monoglucósidos son semejantes a las de los compuestos a partir de los que se forman, con un máximo igual al del 3-monoglucósido inicial y otro correspondiente al del ácido p-cumárico o al del cafeico. Si se trata de acetatos, no presentan ningún máximo correspondiente a éste.
- En los casos dudosos de compuestos con espectros muy similares, los espectros de las derivadas de los mismos pueden ser característicos.
- Pueden aparecer derivados del ácido cafeico y del ácido p-cumárico con el ácido tartárico, con espectros muy similares a los de los ácidos iniciales, pero con tiempos de retención más altos.

En base a todo lo expuesto y a los espectros encontrados en la bibliografía se encontraron los siguientes polifenoles en los vinos analizados:

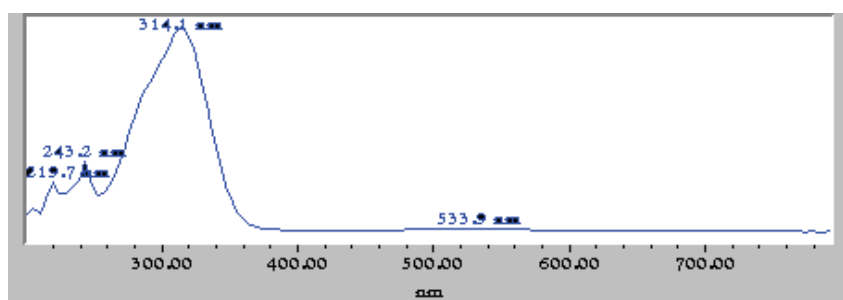
Tabla 55. Polifenoles encontrados en los vinos analizados por HPLC

COMPUESTO	DENOMINACIONES DE ORIGEN		
	RIBEIRA SACRA	RIBEIRO	VALDEORRAS
Caftárico	RS1-RS31	R2-R14	V1-V7, V9-V16
Siríngico	RS2, RS3, RS5, RS8, RS10-RS14, RS16-RS20, RS23-RS26, RS29, RS30	R1, R5, R8, R10, R13, R14	V3-V7, V11, V13, V14, V16
O-cumárico	RS2, RS5, RS12, RS15, RS16, RS18, RS20, RS26, RS29, RS30	R3, R8, R12	V4, V5, V7, V9, V12
Vainillina	RS2, RS3, RS5, RS8, RS11-RS15, RS19, RS23	R2, R5, R9	V1-V3, V6, V7, V10, V11, V14
Isovainillina	RS4, RS10, RS20, RS26, RS27, RS29, RS30	R5	V1, V2, V8, V11, V16
O-vainillina			V12
2,4-dimetoxibenzaldehído		R8	V4, V12
3,5-dimetoxibenzaldehído		R9	V3

Como se comentó anteriormente (página 92), mediante HPLC no se identificaron antocianinas debido a que los espectros de absorción obtenidos a 525 nm eran muy similares y tampoco se disponía de los tiempos de retención de los compuestos a identificar.

Además de estos compuestos se han encontrado unos picos de área importante que no se han podido identificar:

Pico 1. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 8.40 minutos, aparece en los vinos RS1, RS3, RS5, RS7, RS8, RS13-RS16, RS19, RS20, RS22-RS25, R2, R5-R8, R12-R14, V1-V3, V6, V7, V9-V11. Su espectro es el siguiente:

**Fig. 94**

Pico 2. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 10.20 minutos, aparece en los vinos RS1, RS2, RS4-RS6, RS8, RS12, RS16, RS22, R2, R6-R9, R12, V7, V8, V10. Su espectro es el siguiente:

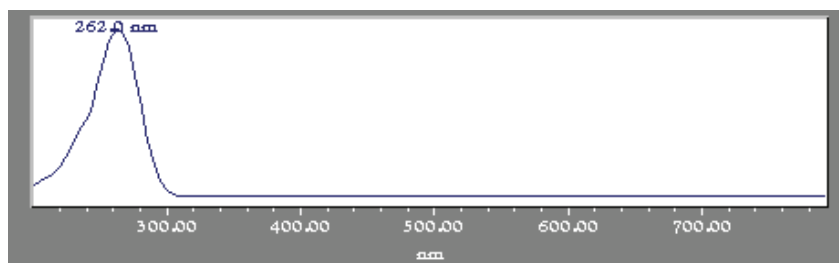


Fig. 95

Pico 3. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 22.93 minutos, aparece en los vinos RS7, RS23, RS30, RS31, R3-R5, V6. Su espectro es el siguiente:

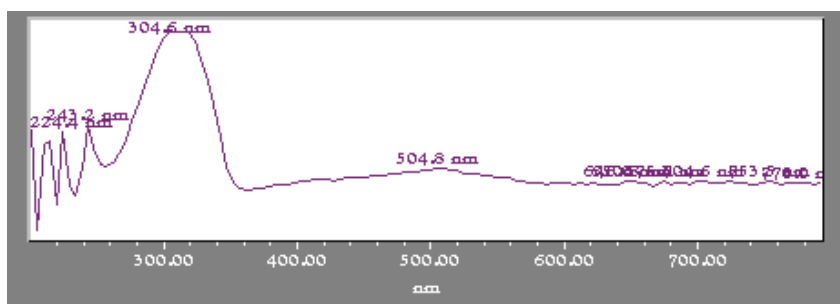


Fig. 96

Pico 4. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 27.50 minutos, aparece en los vinos RS27, RS31, R1, R6, R9, R11, R13, R14, V13. Su espectro es el siguiente:

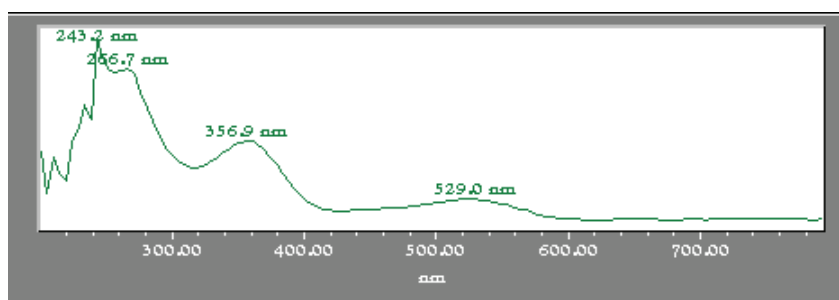


Fig. 97

Pico 5. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 29.73 minutos, aparece en los vinos RS2, RS11, RS26, V13. Su espectro es el siguiente:

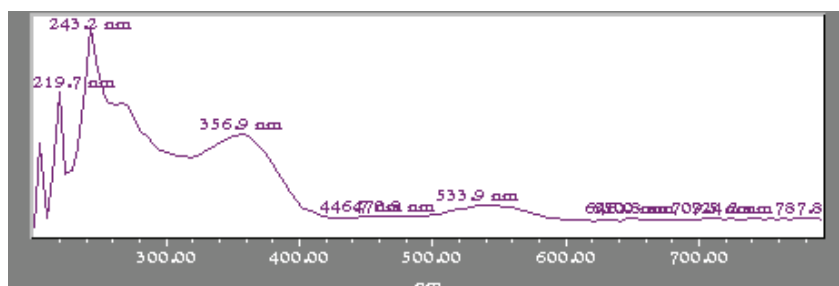


Fig. 98

Pico 6. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 32.28 minutos, aparece en los vinos RS13, RS19, RS30, RS31, R8. Su espectro es el siguiente:

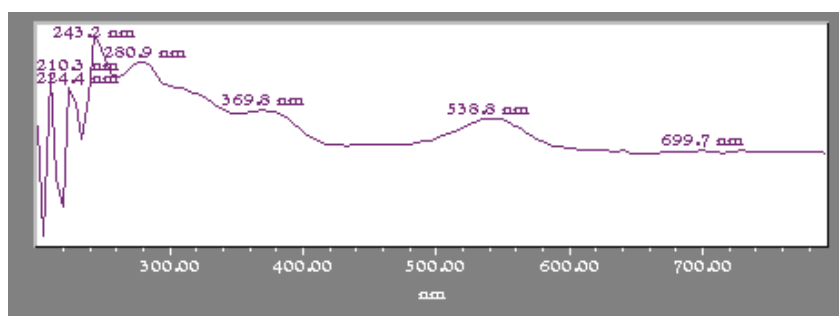


Fig. 99

Pico 7. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 34.45 minutos, aparece en los vinos RS19, RS21, RS22, RS30, RS31, R1, R5-R8, R11-R13, V12-V14. Su espectro es el siguiente:

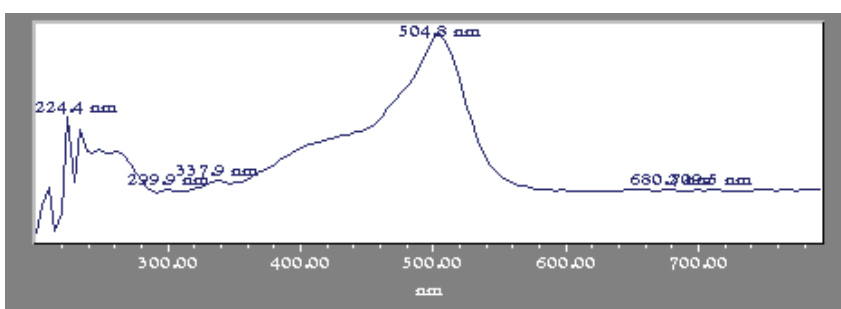


Fig. 100

Pico 8. Con un tiempo de retención alrededor de aproximadamente 35.28 minutos, aparece en los vinos RS6, RS12, RS15, RS16, RS19, RS21-RS27, R1-R7, R9, R11-R14, V4-V6, V9, V13 . Su espectro es el siguiente:

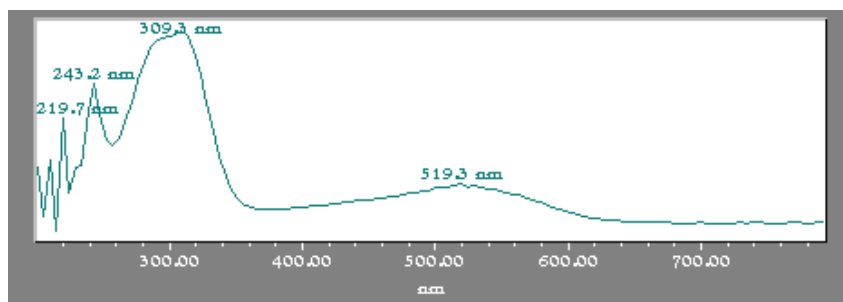


Fig. 101

HPLC/MS

Aquí la identificación de los compuestos de los que no se disponía de patrón se realizó teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente para el equipo de HPLC respecto a los tiempos de retención de los diferentes compuestos y además a partir de los espectros de masas obtenidos para cada uno de ellos teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Santos-Buelga y col. [185] comprobaron que en la fragmentación de las catequinas se produce una pérdida de 152 unidades de masa. Esta misma pérdida se observa en las procianidinas dímeras que contienen unidades elementales de catequinas. Como consecuencia de ello, los espectros de masas muestran además de la señal correspondiente al ión molecular de $m/z = 579$, señales para $m/z = 139$ en el caso de flavanoles monoméricos (catequinas o galocatequinas) y de $m/z = 427$ en el caso de las procianidinas dímeras que contengan dos unidades de (epi)catequinas.

Es importante indicar también que además de los modelos de fragmentación de estos compuestos, una información útil para la identificación de los mismos se puede obtener a partir de sus espectros UV y de sus características de elución. En general, para columnas de fase reversa, los flavanoles con anillos trihidroxilados eluyen más pronto que los correspondientes dihidroxilados.

- Los dímeros de antocianinas-catequinas, son un grupo de compuestos que aparecen durante los procesos de envejecimiento de los vinos y están formados por 3-monoglucósidos de antocianinas y catequinas unidos entre ellos por enlaces de tipo etil para dar dímeros a los que les corresponde una $m/z = 809$ para el caso del

dímero malvidina-catequina y una $m/z = 781$ para el dímero delphinidina-catequina. Estos picos han sido previamente descritos en soluciones modelo [115, 186] y en algunos casos aislados de las fracciones del vino [187].

- Bakker y col. [151] analizando vinos tintos de Oporto por HPLC encontraron una serie de picos sin identificar que eluían poco después del 3-monoglucósido de malvidina, y que constituyen una nueva familia de pigmentos que derivan de los antocianos y que se han descrito como Piranoantocianos o Vitisin [188, 189]. Estos compuestos presentan unas características muy particulares, y es que son de color rojo anaranjado, muy poco sensibles a los cambios de pH y a la decoloración con SO_2 y son químicamente muy estables [115, 189, 190]. Estos autores [189] identificaron y aislaron cuatro pigmentos nuevos derivados de las antocianinas, dos de ellos fueron identificados como el 3-monoglucósido (Vitisin A) y el acetato-3-monoglucósido (acetilvitisin A) de malvidina conteniendo un grupo $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2$ enlazado al carbono 4 y al hidroxilo 5 de su molécula, y los otros dos pigmentos fueron identificados como el 3-monoglucósido (Vitisin B) y el acetato-3-monoglucósido (acetilvitisin B) de malvidina conteniendo una estructura $\text{CH}=\text{CH}$ enlazada al carbono 4 y al hidroxilo 5 de su molécula.

El espectro de masas del Vitisin A produce un ión molecular de 561 unidades de masa, acompañado por un fragmento de masa 399 (162 unidades menos, correspondientes a la pérdida de una molécula de glucosa).

El análisis del Vitisin B da un ión molecular de 517 unidades de masa, acompañado por un fragmento de masa 355 atribuido a la aglicona (vitisin B) después de perder una molécula de glucosa. En la Fig. 102 se puede ver como ocurre la formación de los Vitisin y de p-cumaroil-Vitisin en los vinos [191].

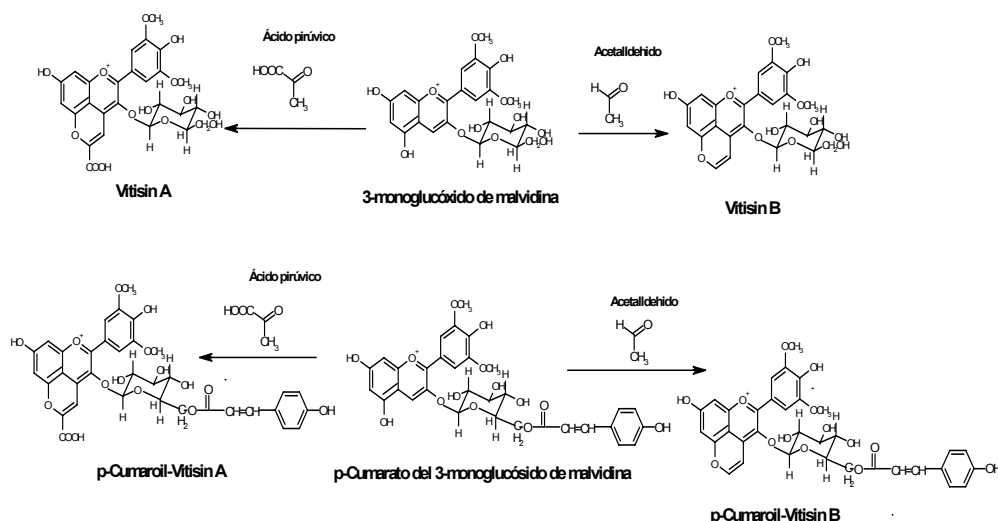


Fig. 102 Formación de Vitisin y p-cumaroilvitisin en vinos tintos

Recientemente, Fulcrand y col. [192] han aislado y caracterizado en soluciones modelo, un compuesto de estructura similar que se cree que proviene de la condensación entre el 3-monoglucósido de malvidina y el ácido pirúvico y lo denominaron como derivado pirúvico del 3-monoglucósido de malvidina.

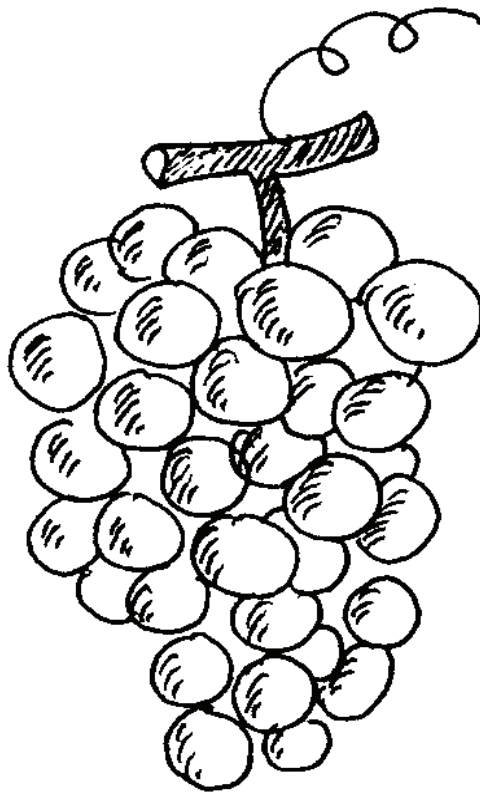
En base a todo lo expuesto se encontraron los siguientes polifenoles:

Tabla 56. Polifenoles encontrados en los vinos analizados por HPLC/MS

COMPUESTO	DENOMINACIONES DE ORIGEN		
	RIBEIRA SACRA	RIBEIRO	VALDEORRAS
+Catequina	RS5, RS6, RS9, RS11- RS13, RS16, RS18, RS20, RS26	R1, R4-R6, R8, R11, R14	V3, V4
Quercetina	RS2, RS3, RS7, RS15, RS16, RS24, RS25, RS27, RS31	R2, R3, R8, R9	V2, V5-V7, V9, V11, V15
Epigallocatequina	RS8, RS12, RS13, RS16, RS17, RS29		
B1	RS3, RS9-RS12, RS14, RS15, RS17-RS25, RS28- RS31	R2-R4, R6-12, R14	V1, V2, V6-V8, V10- V12, V14, V15
B2	RS9, RS12, RS15, RS17, RS21, RS24, RS26, RS28, RS31	R2-R4, R8-R12	V3, V9, V15
Vitisin A	RS1-RS3, RS5, RS6, RS11, RS12, RS14, RS19, RS21, RS23, RS26	R6, R11-R13	V2, V3, V8-V11
Vitisin B	RS2, RS5, RS7, RS8, RS12, RS21, RS23-RS25, RS27	R4, R5, R7, R12	V7, V9, V11, V14
Dímero delphinidina-catequina	RS2, RS5, RS6, RS9, RS11, RS12, RS14, RS15, RS18-RS28	R3, R4, R6-R10, R12-R14	V2-V4, V7-V16
Dímero malvidina-catequina	RS23	R13	
p-Cumarato del 3-monoglucósido de petunidina	RS31	R10	

En los vinos RS3, RS19, RS22, RS30, RS31, R2, R7, R12, R14, V5, V6, V8, V15, V16, aparece un pico cuyo espectro de masas corresponde a una $m/z = 609$. Revilla y col. [175] identificaron este pico como Malvidina condensada. Según estos autores, este compuesto sólo aparece cuando se analizan vinos envejecidos, aunque no es el caso de los vinos que se han analizado en este trabajo.

6. ANÁLISIS DE FENOLES TOTALES Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



6.1– MÉTODO DE ANÁLISIS DE FENOLES TOTALES

Existen diferentes métodos para determinar los compuestos fenólicos totales presentes en un vino, si bien la mayoría de los enólogos suelen referirse al índice de polifenoles totales (IPT) o al índice de Folin-Ciocalteu, que dan una idea general de la concentración global de estos compuestos en un vino. Estas medidas son de gran utilidad pero no especifican la composición del vino en los diferentes compuestos fenólicos. El método escogido en este trabajo para medir los fenoles totales es el de Folin-Ciocalteu. Dicho método es el oficial de la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos). El reactivo está constituido por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que se reduce, por la oxidación de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima entorno a 765 nm y ésta es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos. Por tanto, la respuesta de este análisis depende de la cantidad de fenoles presentes: el número de grupos $-\text{OH}$ o grupos potencialmente oxidables controlan la intensidad de color formado.

El procedimiento dado a continuación es el de Singleton y Rossi [121]. Primero se prepara el reactivo de Folin-Ciocalteu, una disolución de carbonato sódico y una disolución stock de fenol, es decir de ácido gálico.

Con la disolución de ácido gálico se construye una curva de calibrado, preparando disoluciones de distinta concentración del mismo. A cada una de ellas se le añade el reactivo de Folin-Ciocalteu y la disolución de carbonato sódico. Posteriormente se mide la absorbancia de estas disoluciones y se representa frente a la concentración de ácido gálico, obteniendo así la recta de calibrado (Fig. 103).

Una vez que se tiene dicha recta, se repite el mismo procedimiento para las muestras, obteniendo así el equivalente de ácido gálico (mg/L) para cada muestra [193].

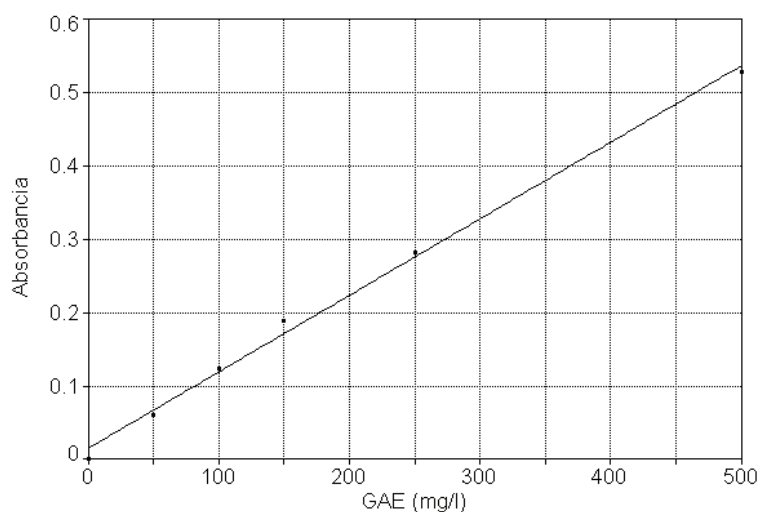


Fig. 103

6.2- MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El método empleado para el estudio de la actividad antioxidante es una modificación del método de Rice-Evans y Miller [136].

Es una técnica espectrofotométrica que mide la capacidad relativa de los agentes antioxidantes para atacar el catión radical $ABTS^+$, comparándola con la potencia antioxidante del estándar Trolox. El catión $ABTS^+$ es un cromógeno azul verdoso con absorción característica a 734 nm.

Se mide primero la absorbancia del Trolox 6 mM, después se incuba el $ABTS^+$ (pág. 41) a 37°C y se mide la variación de absorbancia al minuto y al cabo de 6 min. Por último se mide la absorbancia de cada muestra tanto al primer minuto como a los 6 min.

Después de haber realizado esto, se miden las absorbancias de las reacciones que tienen lugar: se mezclan 1 mL de $ABTS^+$ con 10 μ L de Trolox y se mide su absorbancia al primer minuto y al cabo de 6 minutos. Se repite la misma operación, pero ésta vez mezclando 1 mL de $ABTS^+$ con 10 μ L de muestra de vino.

Una vez que se obtienen todos estos datos, ya se puede obtener la actividad antioxidante total, expresada en equivalentes Trolox (mmol/L), mediante la siguiente fórmula [67]:

$$\text{TAA} = \frac{(6 \text{ mM Trolox}) * (\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ muestra})}{(\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ Trolox})}$$

$A_2 - A_1 = \Delta A$ blanco, de la muestra o del Trolox 6.00 mM.

A_1 : Absorbancia al primer minuto de la reacción.

A_2 : Absorbancia a los seis minutos de la reacción.

Con los datos de absorbancia se puede calcular directamente la actividad antioxidante de las muestras, expresada como equivalentes de Trolox, tal como se acaba de exponer.

6.3– RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 57 y 58 se recogen los valores obtenidos para fenoles totales y actividad antioxidante respectivamente, para cada uno de los vinos objeto de estudio.

Tabla 57. Fenoles totales para las muestras de vino analizadas

Código	Vinos analizados	Cosecha	GAE (mg/L)
RS1	Marqués de Garoña	1999	1600.7
RS2	Vía Romana	1999	2716.1
RS3	Viña Portotide	1999	1436.1
RS4	Abadía da Cova Roble	1999	2313.8
RS5	Cividade	2000	1719.5
RS6	Don Bernardino	2000	1838.4
RS7	Rectoral de Amandi	2000	1829.2
RS8	Viña Portotide	2000	1875.0
RS9	Don Bernardino (cosecha especial)	2000	2176.6
RS10	Abadía da Cova Roble	2000	2460.1
RS11	Viña Vella	2000	2268.1
RS12	Viña Sancosmede	2000	2030.4
RS13	Viñal de Diamondi	2000	1874.9
RS14	Beira	2000	2057.8
RS15	Viña de Neira	2000	2076.1
RS16	Val de Quiroga	2000	2258.9
RS17	Viña Cazoga	2000	2386.9
RS18	Abadía da Cova	2000	2249.8
RS19	Ribeira de Valboa	2000	1792.7
RS20	Ribeira de Pantón	2000	2066.9
RS21	Pincelo	2000	2350.4
RS22	Don Darío	2001	2496.7
RS23	Rectoral de Amandi	2001	2304.7
RS24	Ribeira de Pantón	2001	2313.8
RS25	Beira	2001	2012.1
RS26	Viña Cazoga	2001	2533.2
RS27	Abadía da Cova	2001	2643.0
RS28	Cividade	2001	1993.8
RS29	Vía Romana	2001	2268.1
RS30	Viña Sancosmede	2001	2286.4
RS31	Viña de Neira	2001	2322.9
R1	Alen da Istoria	1999	2066.9
R2	Viña do Campo	1999	2185.8
R3	Eidos Ermos	1999	2377.8
R4	A Forna dos Pasás	1999	2195.0
R5	Viña do Campo	2000	1774.4

Código	Vinos analizados	Cosecha	GAE (mg/L)
R6	O'Ventosela	2000	2268.1
R7	Soñal	2000	2624.7
R8	Rey la Fuente	2000	2533.2
R9	Pazo	2000	2899.0
R10	A Forna dos Pasás	2000	2359.5
R11	Pazo	2001	2716.1
R12	O'Ventosela	2001	2332.1
R13	Soñal	2001	2432.7
R14	Alen da Istoria	2001	2716.1
V1	Viña Camba	1999	1765.2
V2	Señorío de Roblido	1999	2606.4
V3	Mencío	1999	1810.9
V4	Odil	1999	2505.8
V5	Joaquín Rebolledo	1999	2066.9
V6	Albar	1999	1810.9
V7	Mencío	2000	1572.2
V8	Joaquín Rebolledo	2000	1957.2
V9	Señorío de Roblido	2000	2999.5
V10	Pingadelo	2000	1838.4
V11	Albar	2000	1719.5
V12	Galiciano	2000	2167.5
V13	Medulio	2001	2094.4
V14	Mencío	2001	1893.2
V15	Señorío de Roblido	2001	2277.2
V16	Joaquín Rebolledo	2001	2542.4

Tabla 58. Actividad antioxidante para las muestras de vino analizadas

Código	Vinos analizados	Cosecha	AAE (mM Trolox equiv)
RS1	Marqués de Garoña	1999	16.71
RS2	Vía Romana	1999	24.00
RS3	Viña Portotide	1999	15.43
RS4	Abadía da Cova Roble	1999	23.14
RS5	Cividade	2000	20.31
RS6	Don Bernardino	2000	22.50
RS7	Rectoral de Amandi	2000	16.71
RS8	Viña Portotide	2000	20.50
RS9	Don Bernardino (cosecha especial)	2000	30.00
RS10	Abadía da Cova Roble	2000	27.00
RS11	Viña Vella	2000	25.50
RS12	Viña Sancosmede	2000	21.86
RS13	Viñal de Diamondi	2000	22.71
RS14	Beira	2000	21.00
RS15	Viña de Neira	2000	21.43
RS16	Val de Quiroga	2000	26.57
RS17	Viña Cazoga	2000	24.43
RS18	Abadía da Cova	2000	22.71
RS19	Ribeira de Valboa	2000	22.15
RS20	Ribeira de Pantón	2000	21.43
RS21	Pincelo	2000	19.28
RS22	Don Darío	2001	26.57
RS23	Rectoral de Amandi	2001	21.43
RS24	Ribeira de Pantón	2001	19.28
RS25	Beira	2001	15.86
RS26	Viña Cazoga	2001	18.92
RS27	Abadía da Cova	2001	27.23
RS28	Cividade	2001	15.00
RS29	Vía Romana	2001	17.57
RS30	Viña Sancosmede	2001	19.28
RS31	Viña de Neira	2001	18.43
R1	Alen da Istoria	1999	15.86
R2	Viña do Campo	1999	21.23
R3	Eidos Ermos	1999	22.29

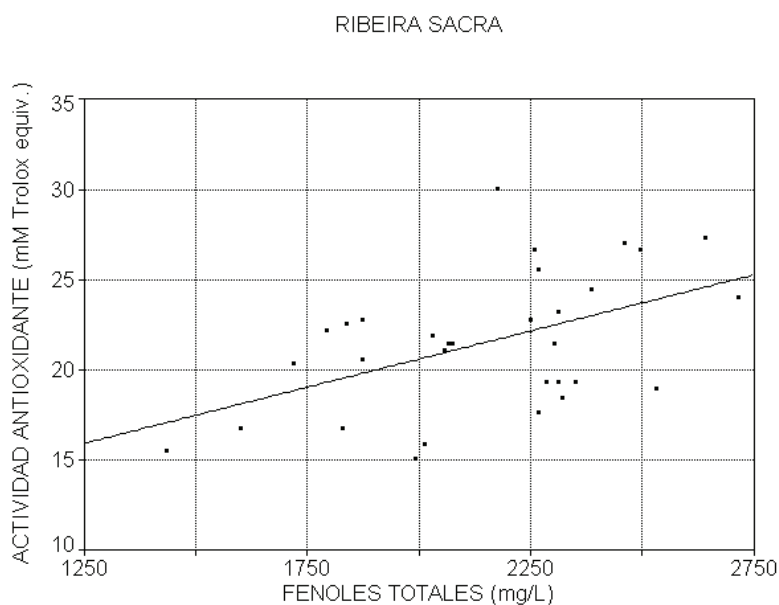
Código	Vinos analizados	Cosecha	AAE (mM Trolox equiv)
R4	A Forna dos Pasás	1999	22.15
R5	Viña do Campo	2000	16.28
R6	O'Ventosela	2000	18.86
R7	Soñal	2000	24.92
R8	Rey la Fuente	2000	25.85
R9	Pazo	2000	24.86
R10	A Forna dos Pasás	2000	25.29
R11	Pazo	2001	21.00
R12	O'Ventosela	2001	21.86
R13	Soñal	2001	21.86
R14	Alen da Isteria	2001	24.50
V1	Viña Camba	1999	19.85
V2	Señorío de Roblido	1999	22.71
V3	Menciño	1999	15.69
V4	Odil	1999	25.71
V5	Joaquín Rebolledo	1999	21.86
V6	Albar	1999	21.23
V7	Menciño	2000	21.50
V8	Joaquín Rebolledo	2000	22.29
V9	Señorío de Roblido	2000	26.77
V10	Pingadelo	2000	20.57
V11	Albar	2000	19.71
V12	Galiciano	2000	18.86
V13	Medulio	2001	22.28
V14	Menciño	2001	18.43
V15	Señorío de Roblido	2001	24.00
V16	Joaquín Rebolledo	2001	25.71

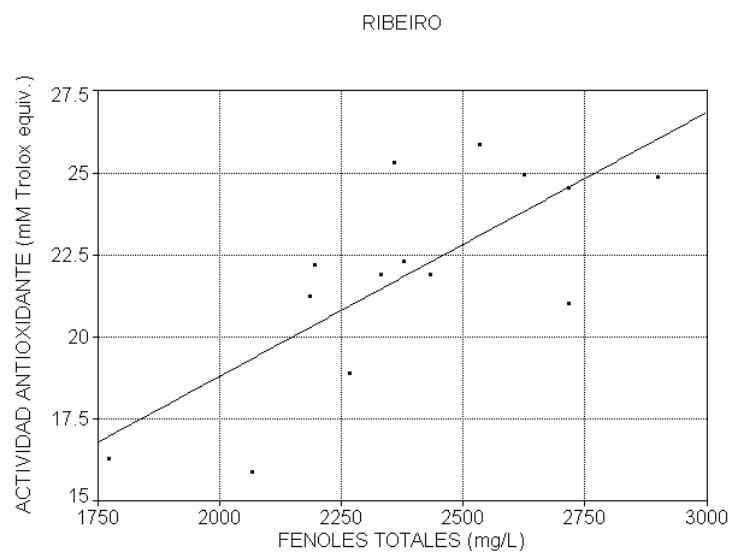
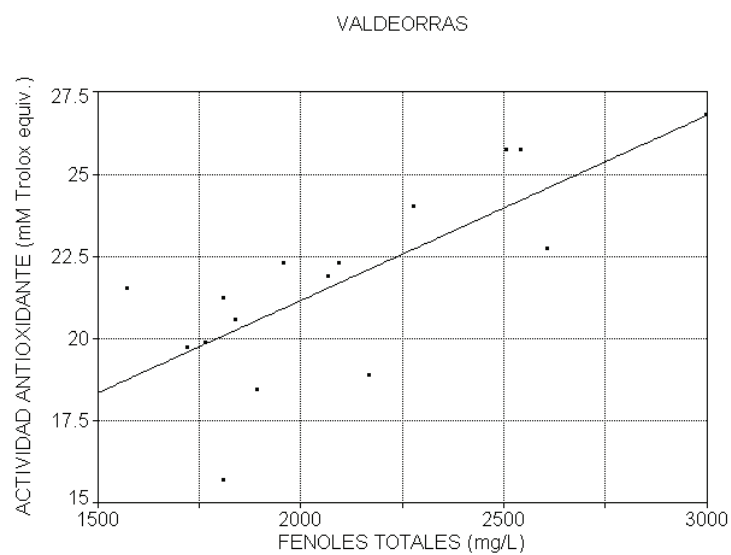
Como muestra la tabla 57, el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu varía desde 1436.1 a 2716.1 mg/L GAE siendo la media de 2146.9 mg/L para la D.O. Ribeira Sacra. Para la D.O. Ribeiro varía entre 1774.4 a 2899.0 mg/L GAE siendo la media de 2391.5 mg/L y para la D.O. Valdeorras están entre 1572.2 a 2999.5 mg/L GAE siendo la media de 2101.7 mg/L. A la vista de estos resultados se aprecia que los valores obtenidos para cada una de las D.O. estudiadas se encuentran dentro del rango de los valores obtenidos por

otros investigadores en otras muestras de vino distintas [122, 129, 178, 180, 194-197].

La media de TAA fue de 21.45 mM equivalentes de Trolox para la D.O. Ribeira Sacra, mientras que para la D.O. Ribeiro fue de 21.92 y para la D.O. Valdeorras de 21.70 mM equivalentes de Trolox. Pellegrini y col. [131] midieron la actividad antioxidante de vinos tintos y encontraron que tenía una media de 16.8 mM Trolox (tenían entre 10.9 a 22.9 mM Trolox).

En las figuras 104-106, se puede ver la correlación existente entre equivalentes de ácido gálico y actividad antioxidante total para cada una de las denominaciones de origen estudiadas. Para la D.O. Ribeira Sacra la correlación encontrada fue de $r = 0.4980$ mientras que para la D.O. Ribeiro fue de $r = 0.7486$ y para la D.O. Valdeorras fue de $r = 0.7516$. Los resultados obtenidos para los vinos de las denominaciones de origen Ribeiro y Valdeorras concuerdan con los obtenidos por Arnous y col. [198] que obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.71 entre polifenoles totales y la actividad antioxidante, mientras que los vinos pertenecientes a la denominación de origen Ribeira Sacra presentan una correlación entre actividad antioxidante y fenoles totales mucho menor.

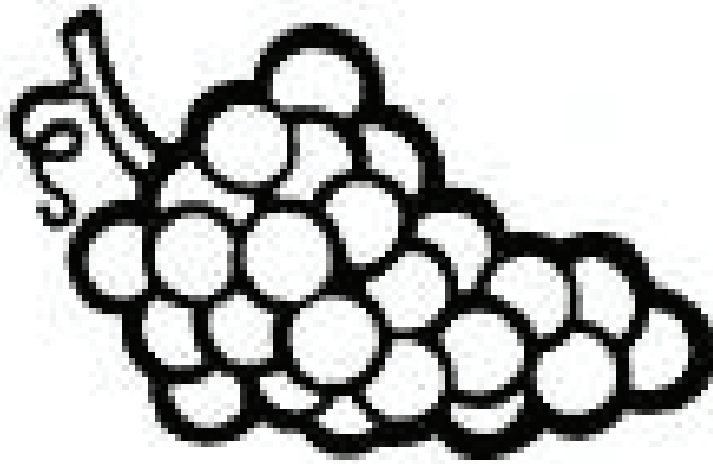


**Fig. 105****Fig. 106**

Cada compuesto polifenólico contribuye de forma diferente a la capacidad antioxidante del vino. Como se dijo anteriormente, cada polifenol tiene una cierta actividad antioxidante, la que se mide en compuestos puros. Sin embargo, en una mezcla como el vino, la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también está determinada por la interacción entre ellos. La moderada correlación existente entre contenido fenólico y actividad antioxidante en los vinos pertenecientes a la denominación de origen Ribeira Sacra, puede ser explicada en parte por la gran diversidad de compuestos existentes, con diversas actividades antioxidantes, dentro de cada familia de compuestos polifenólicos. Además el aporte a la actividad antioxidante de un vino está dada no sólo por la cantidad de polifenoles sino que el estado en que éstos se encuentren puede influenciar significativamente. Aquí hay que señalar también que la actividad antioxidante de un vino, no sólo va a estar influenciada por la variedad de uva, sino también por el proceso de elaboración y por el envejecimiento del mismo.

Queda patente que, puesto que los polifenoles tienen un papel relevante en la actividad antioxidante y dado que existe una correlación entre ambos, sobre todo para los vinos pertenecientes a las denominaciones de origen Ribeiro y Valdeorras, los equivalentes de ácido gálico encontrados indican la capacidad antioxidante de los mismos. En el caso de la D.O. Ribeira Sacra y a la vista de los datos obtenidos, parece que la capacidad antioxidante aquí es menor. Esto podría inducir a pensar que los niveles de concentración de polifenoles para esta D.O. son menores; sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos, y tras el tratamiento estadístico realizado y expuesto en el siguiente apartado de esta memoria (7- estudio quimiométrico) no hay una diferencia significativa de esta zona con respecto a Ribeiro y Valdeorras. Parece por tanto que, como se ha mencionado, otras interacciones existentes en los compuestos del vino están influenciando estos valores.

7. ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO



Uno de los objetivos de la quimiometría es, mediante la aplicación de técnicas matemáticas asistidas por ordenador [199], analizar los datos analíticos de los que se dispone con el fin de extraer de ellos la mayor cantidad de información posible.

Así, en este trabajo se hizo uso de las técnicas quimiométricas con este fin. Se emplearon técnicas de análisis multivariante para extraer información de los resultados obtenidos al cuantificar 17 compuestos polifenólicos en 61 muestras de vinos tintos gallegos pertenecientes a tres denominaciones de origen diferentes y de tres cosechas distintas para ver si es posible a partir de los datos disponibles llevar a cabo una clasificación de dichas muestras en base a su contenido polifenólico.

7.1- TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

En 1975, *The Chemometrics Society* definió la Quimiometría como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”.

Actualmente se realizan diferentes análisis a todo tipo de alimentos para dar respuesta a los problemas planteados en el control alimentario. En la química de alimentos se pretende garantizar la calidad del producto en base a su composición, origen y edad [200].

Los parámetros que pueden influir en la composición de un alimento conforman lo que se denomina *el espacio de las causas* y *el espacio de los efectos*. Entre los primeros se encuentran parámetros como: familia del producto, clase, variedad, tratamientos industriales, envejecimiento, etc. El espacio de los efectos está constituido por la propia composición del alimento que determina las propiedades y la calidad del mismo: aroma, precio, sabor, olor, textura, valor nutricional, etc. El *espacio químico* es intermedio entre el espacio de las causas y el espacio de los efectos, y está formado por las variables químicas medidas en el alimento.

Como consecuencia del elevado número de descriptores de las muestras (tanto en el espacio de las causas y los efectos, como en el espacio químico) es necesario el empleo de poderosas herramientas de análisis para establecer relaciones causa-efecto en base a las variables químicas medidas. La quimiometría suministra estas herramientas y además facilita la posibilidad de que este estudio pueda realizarse en función del conjunto de variables mínimas para dar solución al problema analítico planteado, optimizando así los costes, tiempo y esfuerzo.

Bajo la denominación de “clasificación” se agrupan una serie de procedimientos, conocidos como *técnicas de reconocimiento de modelos* (Pattern recognition) que incluyen técnicas de visualización y reducción de la dimensionalidad, y técnicas de clasificación. Estas técnicas lo que hacen es relacionar el espacio químico con el espacio de las causas y de esta forma se puede asignar una muestra alimentaria a una categoría. Este ha sido hasta la actualidad uno de los campos de mayor actividad de la quimiometría en el ámbito de la química de los alimentos puesto que ha permitido la diferenciación de muestras por su origen y ha posibilitado la detección de fraudes alimentarios.

Cada muestra se caracteriza por un conjunto de medidas y a este conjunto se le llama *pattern*. Cuando sólo se miden dos variables para cada muestra, esta información se puede representar gráficamente, como se muestra en la figura 107, donde las coordenadas del punto dan los valores que toman las dos variables. El punto (la muestra) también se puede definir mediante un vector, llamado *vector de datos*, uniendo el origen con el punto.

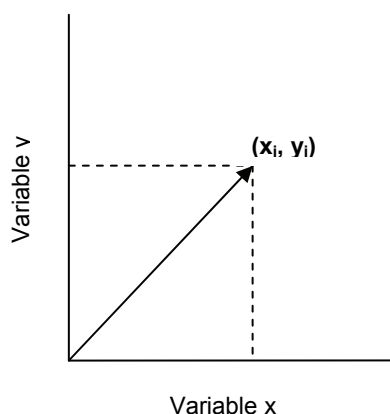


Fig. 107 Representación de una muestra en el espacio definido por las variables x e y

La base de todas las técnicas de *pattern recognition* es que los vectores que representan muestras similares, tendrán vectores de datos similares, es decir, estarán unos cerca de otros en el espacio definido por las variables estudiadas. En dos o tres dimensiones estos agrupamientos son fácilmente detectables por el ojo humano, sin embargo, cuando una muestra se caracteriza a través de n variables, dicha muestra se define por un vector de datos que representa un punto en un espacio n -dimensional, por lo que es necesario el empleo de métodos matemáticos multivariantes para la identificación de los grupos.

En general, previamente a la aplicación de estos procedimientos, es necesario generalmente un escalado de los datos con el fin de eliminar la influencia

que sobre las técnicas de clasificación pueda ejercer el diferente tamaño y escala de los datos. Con fines de clasificación, en principio todas las variables tienen igual importancia, por lo que debe evitarse un mayor “peso” de las variables con valores numéricos superiores frente a aquellas de valores inferiores.

Las técnicas más usadas para llevar a cabo este procesamiento de datos son normalmente el autoescalado o el escalado por rango, aunque existen otras técnicas que se aplican menos [201].

En el *autoescalado*, al valor original de la variable se le resta la media de la misma y se divide por la desviación estándar obteniéndose un nuevo valor para dicha variable (Z_{ij}).

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{S_j}$$

Así, se obtiene una nueva variable de media 0 y desviación estándar 1. Geométricamente, se determina el valor de cada variable para un objeto i como una estimación del valor de esa variable respecto al valor medio de la misma medido en unidades de desviación estándar.

En el *escalado por rango*, se escalan las variables para que tomen valores entre 0 y 1 mediante la transformación siguiente:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \min(X_{ij})}{\max(X_{ij}) - \min(X_{ij})}$$

Así, se obtienen al igual que en el caso del autoescalado, variables medidas en una misma escala, evitando la influencia de los diversos tamaños de las variables en los resultados obtenidos.

A) TÉCNICAS DE APRENDIZAJE NO SUPERVISADO

En estas técnicas no es necesaria información acerca de la pertenencia de las muestras a un determinado grupo o categoría. En ellas, se hace un agrupamiento de las muestras en base a la similitud entre ellas.

Análisis de Clusters

Es una técnica quimiométrica que agrupa las muestras de acuerdo con la similitud entre ellas y considera que muestras muy similares entre sí pertenecen al mismo grupo o categoría. Dada su simplicidad interpretativa se ha aplicado con frecuencia para evaluar agrupamientos en distintos tipos de muestras [202-205].

Se basa en que la similaridad entre las muestras es inversa a la distancia que las separa en un espacio de un número de dimensiones igual al número de variables. Mediante el cálculo de las distancias entre todas las muestras entre sí, se puede definir la similaridad S_{ij} entre dos muestras i y j como:

$$S_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{\max}}$$

De esta forma se normaliza el valor de las similaridades entre 0 (muestras menos similares) y 1 (muestras más similares). Se obtiene así una matriz de similaridades, que es una medida de las distancias que separan las muestras en el espacio original. Dicha matriz, es una matriz cuadrada y simétrica ($S_{ij} = S_{ji}$) de diagonal 1 ($S_{ii} = 1$). A partir de ella, se agrupan formando un grupo o *cluster* las dos muestras más similares. A continuación las dos muestras unidas formando un cluster se sustituyen por su punto medio y se repite el proceso n-1 veces (n es el número de muestras), se calculan las distancias entre todas las muestras considerando el cluster como una muestra más, se calculan las similaridades y se unen de nuevo la muestra-cluster de mayor similaridad.

El agrupamiento se representa en forma de dendograma (Fig. 108), y su aspecto es el de un árbol que se bifurca desde un tronco común hasta alcanzar tantas ramas como objetos se pretenden agrupar o clasificar. El tronco común está constituido por el conjunto de todos los objetos, y constituye el grupo de mayor rango o jerarquía. El tronco se bifurca hasta alcanzar los objetos aislados, que ostentan la jerarquía más baja. Debido a que los objetos quedan ordenados jerárquicamente, por ello se dice que el análisis de cluster es una técnica de análisis jerárquico.

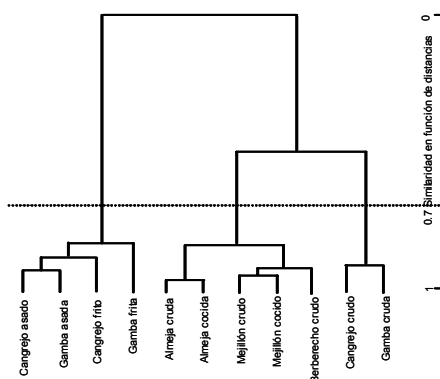


Fig. 108 Ejemplo de un dendograma en análisis de clústers

En este procedimiento, existen dos etapas que condicionan los resultados obtenidos:

- cómo se realiza el cálculo de las distancias entre objetos
- cómo y por qué valor se sustituyen 2 muestras que han sido agrupadas en un ciclo anterior para el nuevo cálculo en el ciclo siguiente.

Para realizar el cálculo de las distancias entre objetos, puede responderse diciendo que en principio cualquier distancia entre 2 puntos i y j que se pueda definir es válida, siempre que cumpla las siguientes condiciones:

- 1.- $d_{ij} \geq 0$
- 2.- $d_{ij} = d_{ji}$
- 3.- $d_{ii} = 0$
- 4.- $d_{ij} \leq d_{ik} + d_{kj}$

Hecho este planteamiento, las distancias más habitualmente empleadas son las siguientes:

1.- Distancia Euclídea:
$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

2.- Distancia de Manhattan:
$$d_{ij} = \sum_{k=1}^n |x_{ik} - x_{jk}|$$

3.- Distancia de Minkowski:
$$d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^n |x_{ik} - x_{jk}|^m \right]^{\frac{1}{m}}$$

En determinados casos se usa una distancia particular denominada distancia de Mahalanobis [206], que presenta la ventaja de resultar invariable frente a transformaciones lineales de las variables.

4.- Distancia de Mahalanobis:
$$d_{xt}^2 = (x_i - t)^T \text{Cov}^{-1}(x_i - t)$$

La segunda cuestión puede responderse de varias formas, obteniéndose así métodos diferentes según cual sea el criterio usado para decidir cómo se realiza el agrupamiento entre muestras o clusters. Los más importantes son:

1.- *Enlace simple*: La distancia entre dos clusters se calcula como la distancia menor que existe entre los dos elementos más cercanos, cada uno de ellos pertenecientes a uno de los clusters considerados.

2.- *Enlace completo*: Es opuesto al anterior y en él, la distancia entre dos clusters se calcula como la mayor distancia existente entre los dos elementos más lejanos, cada uno de ellos perteneciente a uno de los clusters considerados.

3.- *Enlace promedio*: Cuando dos grupos o clusters han sido unidos, la distancia entre el nuevo cluster y un cluster ya existente se calcula como promedio de la distancia entre cada uno de los dos clusters y el cluster existente. En este caso existe una variante en la que la distancia es ponderada de acuerdo con el número de individuos que forman un determinado cluster.

4.- *Método del centroide*: El agrupamiento de cluster se basa en la distancia entre los centroides de los clusters, agrupándose en cada paso aquellos clusters cuya distancia intercentroides sea mínima.

5.- *Método de Ward*: En este procedimiento el criterio de agrupamiento de clusters es “a posteriori”, ya que se evalúan las posibles combinaciones de clusters que se pueden producir y se elige aquella que minimiza la heterogeneidad, definiéndose ésta como la suma de las distancias al cuadrado de cada elemento del cluster al centroide.

En el presente trabajo las similitudes fueron calculadas a partir de la distancia Euclídea y el método de Ward fue el empleado para el establecimiento de clusters.

B) TÉCNICAS DE VISUALIZACIÓN Y REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD

Estas técnicas son procedimientos en los que mediante reducciones de la dimensionalidad de los datos, se consigue una visualización de éstos con la pérdida de la mínima cantidad de información posible. Un ejemplo de ellas, es el Análisis de Componentes Principales.

Análisis de Componentes Principales

Es una técnica multivariante diseñada en 1901 por Karl Pearson [207] con la finalidad inicial de encontrar líneas y planos que mejor se ajusten a una nube de puntos en el espacio. Hotelling [208] en 1933 partiendo de las ideas del análisis factorial busca determinar el menor “conjunto fundamental de variables independientes ... que determinen los valores de las variables originales”. Hotelling

escoge sus “componentes” de modo que sucesivamente hagan máxima su contribución a la suma total de las varianzas de las variables iniciales; a las componentes así determinadas las llamó **componentes principales**, siendo las variables originales combinación lineal de dichas componentes.

Admítase que se dispone de una matriz de datos X_{jn} , que se obtuvo al medir en j muestras el valor de n variables. El análisis de componentes principales trata de describir la estructura de la nube de puntos que forman las j muestras cuando se les representa en un espacio de n dimensiones en el que cada variable es un eje cartesiano [209]. Para describir el aspecto de la nube de puntos, vamos a buscar la dirección en que es máxima su elongación. La primera componente principal CP_1 es una combinación lineal de las i variables X_j de modo que tenga la mayor varianza posible.

$$CP_1 = a_{11} X_1 + a_{12} X_2 + \dots + a_{1n} X_n$$

Los coeficientes a_{ij} llamados *loadings* dan una idea de la participación de las variables originales en cada componente principal y deben cumplir:

$$a_{11}^2 + a_{12}^2 + \dots + a_{1n}^2 = 1$$

Cada objeto es descrito ahora por unas nuevas coordenadas denominadas *scores*.

La segunda componente principal CP_2 será una nueva combinación lineal de las variables X_j tal que explique la mayor varianza posible de la restante, una vez considerada la primera componente. Esta idea queda recogida por la condición de que la segunda componente sea incorrelada con la primera. Esto obliga a que el vector formado por los *loadings* ($a_{21}, a_{22}, \dots, a_{2n}$) sea ortonormal al vector de *loadings* de CP_1 . Se prosigue este proceso hasta definir la componente n -ésima como la combinación lineal de las variables X_j con coeficientes a_{ij} , $j = 1, \dots, n$ tales que se alcance:

$$CP_i = a_{i1} X_1 + a_{i2} X_2 + \dots + a_{in} X_n$$

$$a_{i1}^2 + a_{i2}^2 + \dots + a_{in}^2 = 1$$

Se pueden construir tantos componentes principales como dimensiones tenga el espacio definido por las variables manifiestas pero, como interesa disponer de la máxima información en un número reducido de dimensiones, se trabajará con

el menor número de componentes principales que nos aporten la máxima información (preferiblemente 2 ó 3).

Cada objeto es descrito ahora por una serie de nuevas coordenadas con respecto a los componentes principales, los *scores*. A partir de los *loadings* pueden calcularse los autovalores o *eigenvalores*, λ_i , que indican cuál es el porcentaje de la varianza total retenida por cada uno de los componentes principales. Se dispone así de la información adecuada para establecer el número de componentes principales necesarios para obtener una correcta representación de los datos originales.

Como λ_i , representa la varianza de la componente principal CP_i , entonces:

$$\sum_{i=1}^n \lambda_i = \text{varianza total}$$

Como los componentes principales están ordenados en orden decreciente de varianza (CP_1 es el que contiene la mayor parte de la varianza de los datos originales), los valores de λ_i son suficientes para determinar la cantidad de componentes principales que contienen un determinado porcentaje de la varianza total.

$$\frac{\lambda_i}{\sum_{i=1}^n \lambda_i} \cdot 100 = \text{Porcentaje varianza cada componente}$$

7.2- ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE VINOS TINTOS GALLEGOS

A continuación se hace uso de las técnicas explicadas anteriormente para estudiar si es posible a partir del contenido polifenólico de los vinos tintos analizados clasificarlos en base a:

- su denominación de origen de pertenencia
- su año de cosecha independientemente de su denominación de origen

7.2.1- ESTUDIO UNIVARIANTE

En primer lugar, se realizó un estudio univariante con el fin de examinar si alguna de las variables por si sola era capaz de discriminar entre las tres D.O. estudiadas. Este estudio consiste en la realización de gráficos Box-Whisker de la

concentración (en ppm) de cada uno de los compuestos polifenólicos encontrados en los vinos. El gráfico divide los datos en cuatro zonas de igual frecuencia. Las dos zonas centrales encierran el 50% del total de la población, mientras que las otras dos zonas se representan por los dos segmentos verticales que parten de cada lado horizontal de la caja. El sistema muestra la mediana como una línea horizontal dentro de la caja.

A) HPLC

En primer lugar hay que tener en cuenta que no todos los gráficos obtenidos tienen la misma significación estadística debido a que algunos de los compuestos estudiados se encuentran en un número reducido de muestras.

Además se pudo comprobar a la vista de las figuras 109-112 que, aunque hay diferencias entre los valores medios obtenidos para los diferentes compuestos polifenólicos, los intervalos de concentración obtenidos para las muestras en función de su pertenencia a una determinada D.O. se superponen, por lo que ninguno de los compuestos analizados constituye un factor discriminante para las tres D.O.

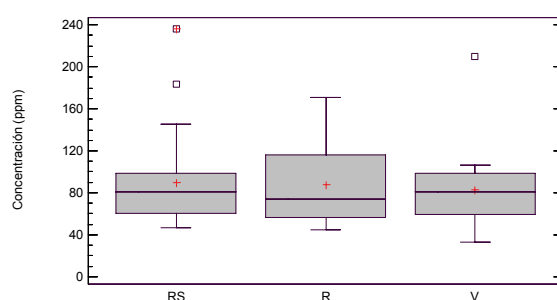


Fig. 109 Diagrama Box-Whisker de la concentración de ácido gálico para las tres denominaciones de origen

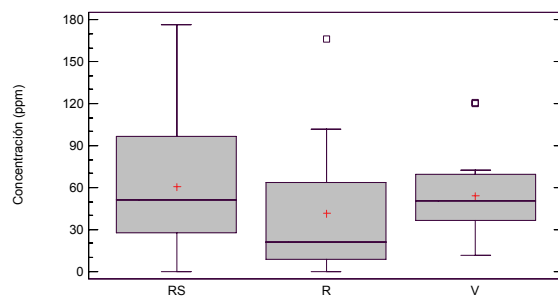


Fig. 110 Diagrama Box-Whisker de la concentración de epicatequina para las tres denominaciones de origen

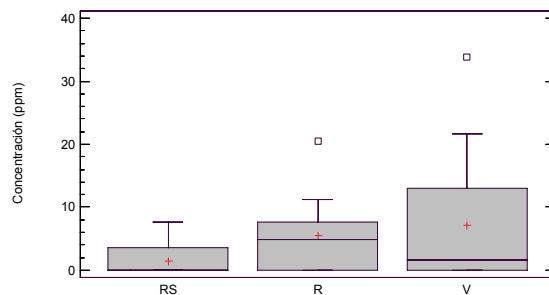


Fig. 111 Diagrama Box-Whisker de la concentración de ácido p-cumárico para las tres denominaciones de origen

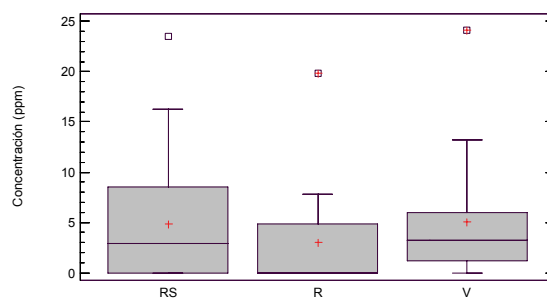


Fig. 112 Diagrama Box-Whisker de la concentración de miricetina para las tres denominaciones de origen

No se ha realizado el estudio univariante para ácido ferúlico y ácido cafeico debido a que el ácido ferúlico sólo aparece en dos muestras pertenecientes a la D.O. Ribeiro y a que el ácido cafeico aparece en 5 muestras pertenecientes a la D.O. Ribeiro y en 3 muestras pertenecientes a la D.O. Valdeorras, no apareciendo en ninguna de las muestras analizadas pertenecientes a la D.O. Ribeira Sacra.

B) HPLC/MS

En este caso en las figuras 113-123 también se observa que aunque hay diferencias entre los valores medios para los diferentes compuestos polifenólicos, aquí también se superponen los rangos obtenidos para las muestras en función de su pertenencia a las diferentes D.O.

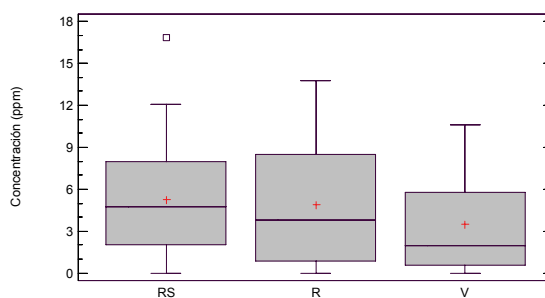


Fig. 113 Diagrama Box-Whisker de la concentración de 3-monoglucósido de delfinidina para las tres denominaciones de origen

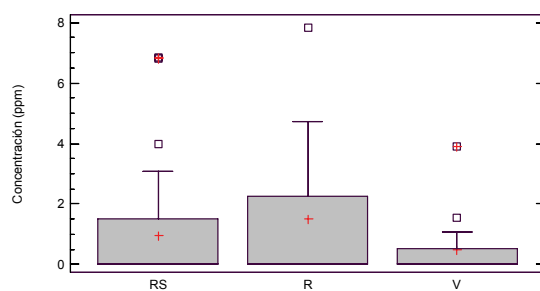


Fig. 114 Diagrama Box-Whisker de la concentración de 3-monoglucósido de cianidina para las tres denominaciones de origen

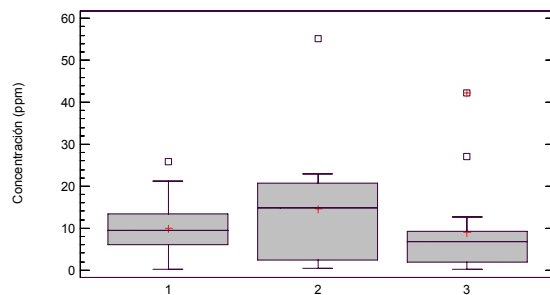


Fig. 115 Diagrama Box-Whisker de la concentración de 3-monoglucósido de petunidina para las tres denominaciones de origen

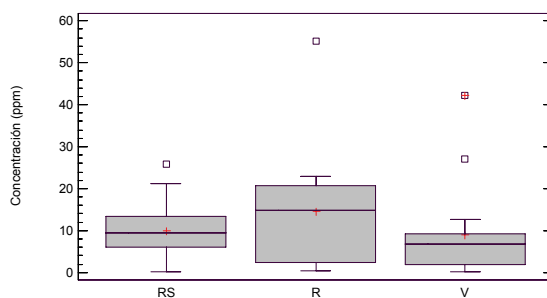


Fig. 116 Diagrama Box-Whisker de la concentración de 3-monoglucósido de peonidina para las tres denominaciones de origen

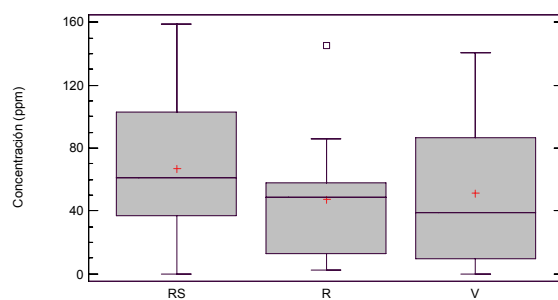


Fig. 117 Diagrama Box-Whisker de la concentración de 3-monoglucósido de malvidina para las tres denominaciones de origen

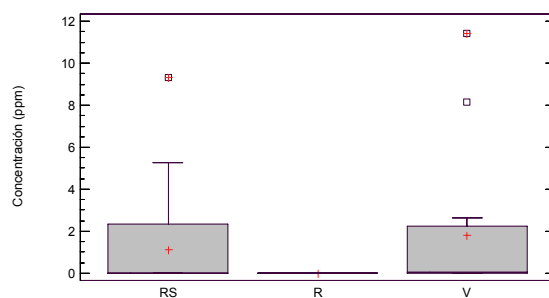


Fig. 118 Diagrama Box-Whisker de la concentración de acetato- 3-monoglucósido de delphinidina para las tres denominaciones de origen

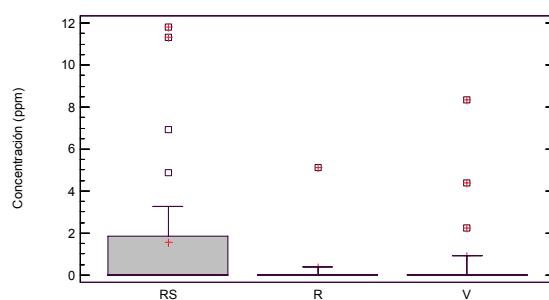


Fig. 119 Diagrama Box-Whisker de la concentración de acetato- 3-monoglucósido de petunidina para las tres denominaciones de origen

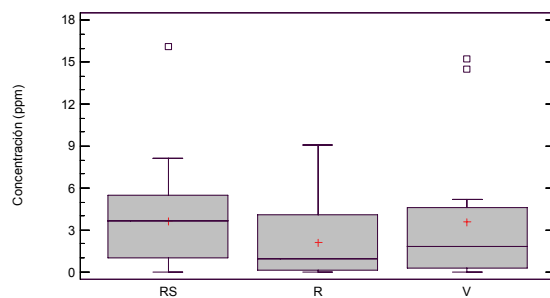


Fig. 120 Diagrama Box-Whisker de la concentración de acetato- 3-monoglucósido de peonidina para las tres denominaciones de origen

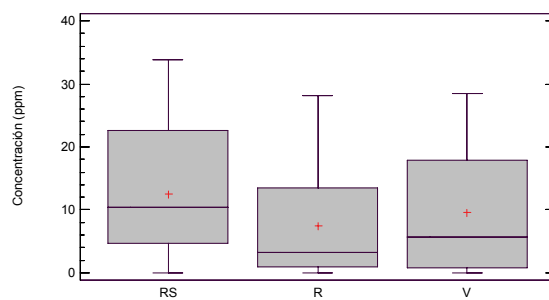


Fig. 121 Diagrama Box-Whisker de la concentración de acetato- 3-monoglucósido de malvidina para las tres denominaciones de origen

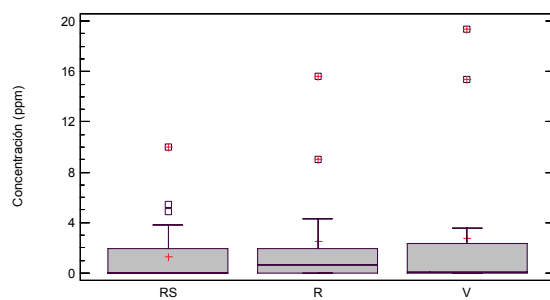


Fig. 122 Diagrama Box-Whisker de la concentración de p-cumarato- 3-monoglucósido de peonidina para las tres denominaciones de origen

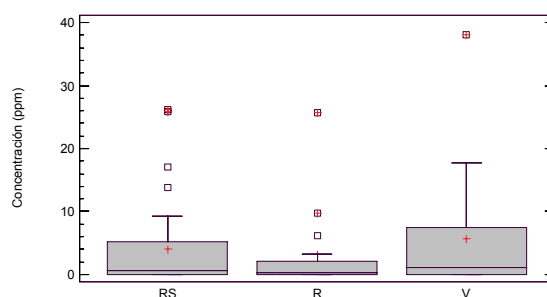


Fig. 123 Diagrama Box-Whisker de la concentración de p-cumarato- 3-monoglucósido de malvidina para las tres denominaciones de origen

Debido a que ninguna de las variables medidas fue por si misma capaz de diferenciar entre las tres denominaciones de origen, se procedió a aplicar a los datos obtenidos las técnicas multivariantes comentadas anteriormente con el fin de estudiar si el conjunto total de los datos obtenidos permitía discriminar entre dichas denominaciones de origen.

7.2.2- ANÁLISIS DE CLUSTERS

El primer paso que se realizó para ver si había diferencias que permitiesen distinguir entre las tres denominaciones de origen fue estudiar la estructura de los datos por análisis de clusters. Este análisis revela el agrupamiento natural existente entre las muestras caracterizadas por los valores de un conjunto de variables medidas.

Para aplicar dicho análisis, los datos fueron autoescalados para eliminar el efecto del diferente tamaño de las variables. La semejanza entre muestras se calculó en base al cuadrado de la distancia Euclídea y el procedimiento de agrupamiento usado fue el Método de Ward [210].

A) HPLC

En la Fig. 124 se muestra el dendograma obtenido en el análisis de clusters para los seis polifenoles identificados en las muestras de vino analizadas por HPLC, atendiendo a su posible clasificación en base a su denominación de origen. Dichos polifenoles son: ácido gálico, epicatequina, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y miricetina.

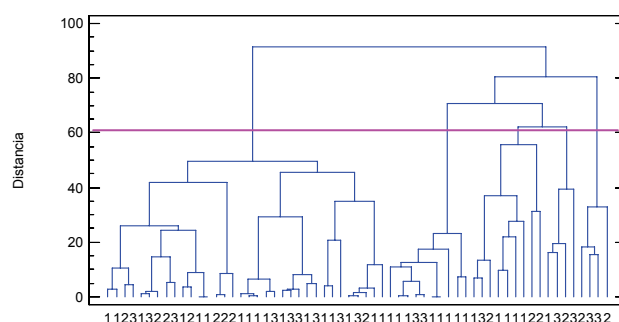


Fig. 124 Dendrograma obtenido en el análisis de clusters para los 6 polifenoles identificados por HPLC : 1.- vinos con D.O. Ribeira Sacra, 2.- vinos con D.O. Ribeiro, 3.- Vinos con D.O. Valdeorras

Como se observa en la figura anterior, para un nivel de similitud superior a 0.6 se pueden identificar cuatro clusters. Los cuatro, están formados por muestras pertenecientes a las tres denominaciones de origen estudiadas ya que se encuentran mezclados vinos pertenecientes a las tres D.O. A medida que disminuimos el nivel de similitud observamos que el número de clusters aumenta.

Debido a que con los datos disponibles no es posible diferenciar qué vinos pertenecen a una u otra denominación de origen, se realizó otro análisis de clusters para ver si se podían distinguir los vinos estudiados en función de la cosecha sin tener en cuenta su denominación de origen de pertenencia.

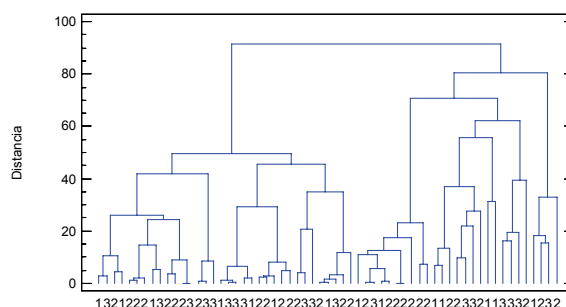


Fig. 125 Dendrograma obtenido en el análisis de clusters para los 6 polifenoles identificados por HPLC: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

Como se puede observar en la Fig. 125, mediante el análisis de clusters tampoco se diferencian los vinos por años de cosechas.

B) HPLC/MS

Con esta técnica también se aplicó el análisis de clusters para llevar a cabo la búsqueda de agrupamientos entre las muestras. Aquí la métrica empleada y el método de agrupación escogido, así como la notación, fueron los mismos que los usados en el análisis por HPLC.

En la Fig. 126 se muestra el dendograma obtenido para los vinos analizados en función de las antocianinas encontradas en los mismos, mediante el análisis por HPLC/MS. Las antocianinas identificadas en los vinos analizados fueron: 3-monoglucósido de delfinidina, 3-monoglucósido de cianidina, 3-monoglucósido de petunidina, 3-monoglucósido de peonidina, 3-monoglucósido de malvidina, acetato del 3-monoglucósido de delfinidina, acetato del 3-monoglucósido de petunidina, acetato del 3-monoglucósido de peonidina, acetato del 3-monoglucósido de malvidina, p-cumarato del 3-monoglucósido de peonidina y p-cumarato del 3-monoglucósido de malvidina.

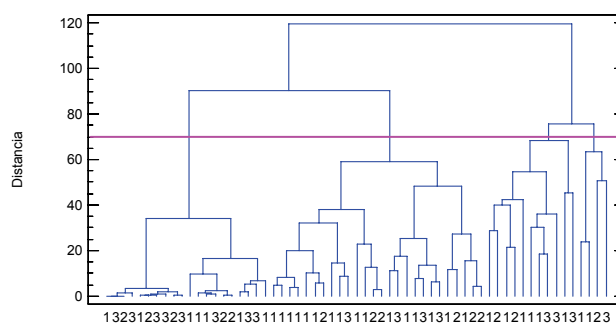


Fig. 126 Dendograma obtenido para las 11 antocianinas identificadas por HPLC/MS: 1.- vinos con D.O. Ribeira Sacra, 2.- vinos con D.O. Ribeiro, 3.- vinos con D.O. Valdeorras

En este caso, para un nivel de similitud de 0.7 se pueden identificar cuatro clusters. Los cuatro, están formados por muestras pertenecientes a las tres denominaciones de origen estudiadas.

Este análisis por tanto confirma los resultados obtenidos por HPLC y es que las muestras de vino no se separan en base a la denominación de origen a la que pertenecen.

Debido a que en este caso con los datos disponibles tampoco es posible diferenciar qué vinos pertenecen a una u otra denominación de origen, se hizo lo mismo que con HPLC, es decir, se realizó otro análisis de clusters para ver si se podían distinguir los vinos estudiados en función de la cosecha sin tener en cuenta su denominación de origen de pertenencia.

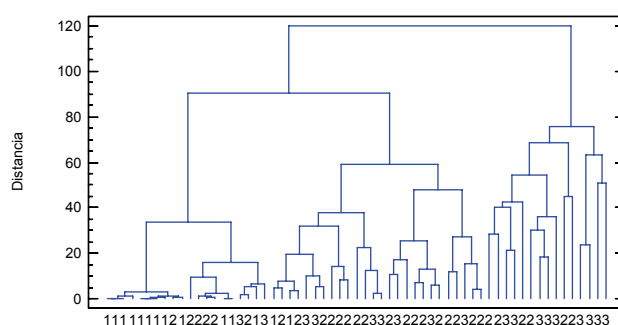


Fig. 127 Dendrograma obtenido para las 11 antocianinas identificadas por HPLC/MS: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

Como se observa en la Fig. 127, tampoco se pueden diferenciar los vinos analizados en función de su cosecha de pertenencia.

C) HPLC Y HPLC/MS

En este apartado, se aplica el análisis de clusters a los datos obtenidos conjuntamente en HPLC y HPLC/MS, es decir, se realiza análisis de clusters para los 17 compuestos polifenólicos identificados en los vinos analizados. En este caso también se hacen dos tipos de análisis diferentes: en primer lugar se comprueba si existen diferencias entre las tres denominaciones de origen estudiadas, para después ver si se diferencian los vinos en función del año de cosecha (independientemente de su denominación de origen de pertenencia).

En la Fig. 128 aparece el dendrograma obtenido para los 17 compuestos polifenólicos identificados según su denominación de origen.

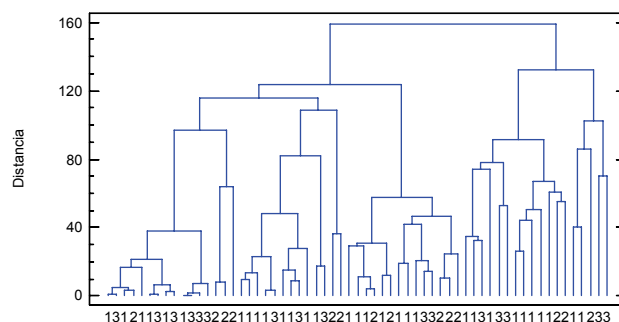


Fig. 128 Dendrograma obtenido para los 17 compuestos polifenólicos identificados según su denominación de origen: 1.- vinos con D.O. Ribeira Sacra, 2.- vinos con D.O. Ribeiro, 3.- Vinos con D.O. Valdeorras

A continuación se representa el dendrograma obtenido para los 17 compuestos polifenólicos identificados según su año de cosecha.

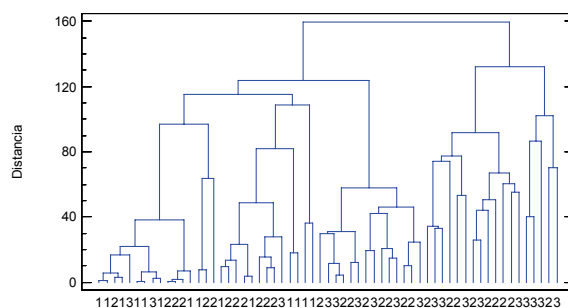


Fig. 129 Dendrograma obtenido para los 17 compuestos polifenólicos identificados según su cosecha: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

A la vista de los resultados obtenidos mediante el análisis de clusters se observa que no es posible establecer una clasificación de los vinos estudiados en función del contenido polifenólico de los mismos.

7.2.3- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Como se comprobará en las figuras siguientes (Figs. 130-135), mediante análisis de componentes principales se confirman los resultados obtenidos en el análisis de clusters, por lo que tampoco va a ser posible establecer diferencias entre las muestras analizadas ni atendiendo a su D.O. de pertenencia, ni por su año de cosecha. A continuación se expone un resumen de los tratamientos estadísticos realizados.

A) HPLC

Se llevó a cabo el análisis de componentes principales considerando la matriz original de los datos después de autoescalarlos. El propósito de este análisis fue obtener un número pequeño de combinaciones lineales de las seis variables (que corresponden a los seis polifenoles identificados mediante el análisis por HPLC) que representen la mayor variabilidad de los datos posible.

Como se puede observar en la Fig. 130, las muestras de vino de las tres denominaciones de origen aparecen mezcladas, por lo que mediante este análisis no es posible establecer diferencias entre las mismas en base a la D.O. a la que pertenecen las muestras, confirmándose de este modo los resultados obtenidos mediante el análisis de clusters.

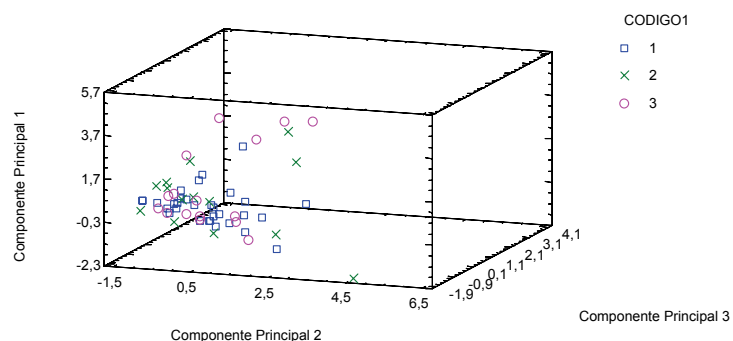


Fig. 130 Representación de las muestras en el espacio generado por las tres primeras componentes principales: 1.- muestras pertenecientes a la D.O. Ribeira Sacra, 2.- muestras de la D.O. Ribeiro, 3.- muestras de la D.O. Valdeorras

Aquí también, al igual que con clusters, se han realizado otros análisis de componentes principales para ver si se podían distinguir los vinos en función de su cosecha.

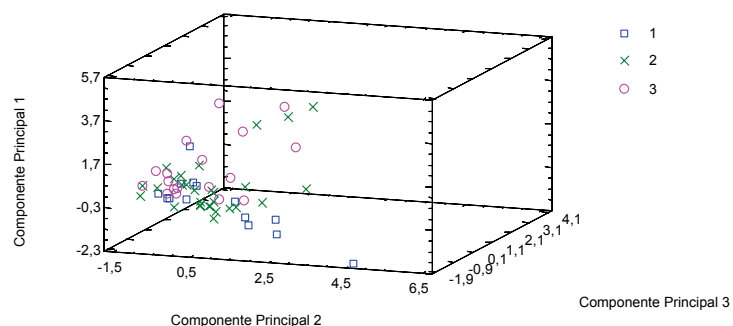


Fig. 131 Representación de las muestras en el espacio generado por las tres primeras componentes principales: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

Como se observa en la Fig. 131 no se pueden diferenciar los vinos por años de cosechas.

B) HPLC/MS

En la Fig. 132 se puede observar que, al igual que en los casos anteriores, no es posible clasificar los vinos estudiados atendiendo a su denominación de origen de pertenencia.

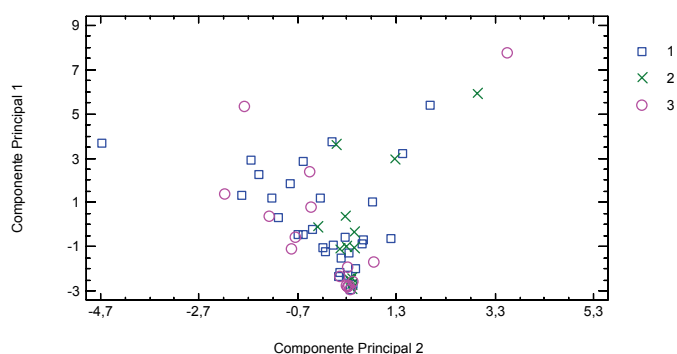


Fig. 132 Representación de las muestras en el espacio generado por las dos primeras componentes principales: 1.- muestras pertenecientes a la D.O. Ribeira Sacra, 2.- muestras de la D.O. Ribeiro, 3.- muestras de la D.O. Valdeorras

A continuación se realiza análisis de componentes principales para ver si se pueden diferenciar los vinos según su año de cosecha.

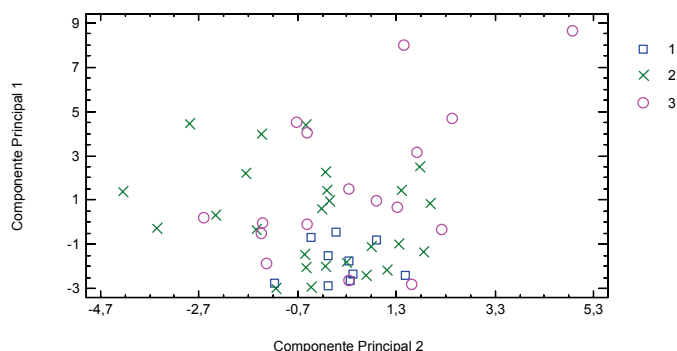


Fig. 133 Representación de las muestras en el espacio generado por las dos primeras componentes principales: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

En este caso tal y como se muestra en la Fig. 133 tampoco se diferencian los vinos por años de cosechas.

C) HPLC Y HPLC/MS

En este apartado, se aplica el análisis de componentes principales a los datos obtenidos conjuntamente en HPLC y HPLC/MS, es decir, se realiza análisis de componentes principales para los 17 compuestos polifenólicos identificados en los vinos analizados. En este caso, al igual que se hizo en el análisis de clusters, también se hacen dos tipos de análisis diferentes: en primer lugar se comprueba si existen diferencias entre las tres denominaciones de origen estudiadas, para después ver si se diferencian los vinos en función del año de cosecha (independientemente de su denominación de origen de pertenencia).

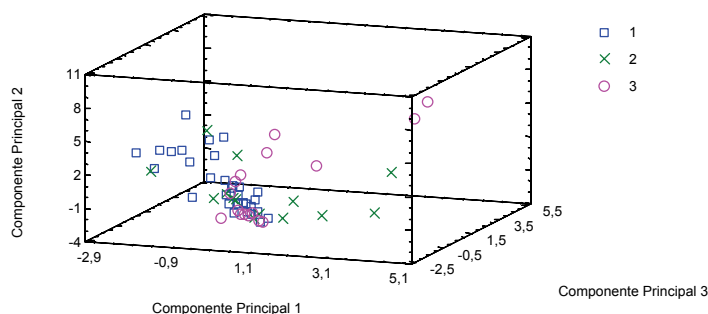


Fig. 134 Representación de las muestras en el espacio generado por las tres primeras componentes principales: 1.- muestras pertenecientes a la D.O. Ribeira Sacra, 2.- muestras de la D.O. Ribeiro, 3.- muestras de la D.O. Valdeorras

Como se observa en la Fig. 134 no se diferencian los vinos según la D.O. a la que pertenecen, por lo que a continuación se realiza análisis de componentes principales para ver si se pueden diferenciar los vinos según su año de cosecha.

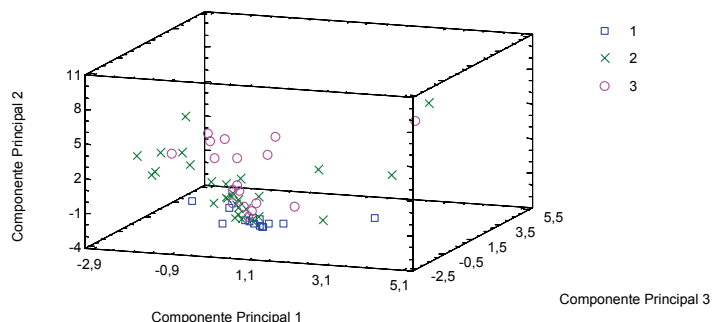


Fig. 135 Representación de las muestras en el espacio generado por las tres primeras componentes principales: 1.- vinos de la cosecha del año 1999, 2.- vinos de la cosecha del año 2000, 3.- vinos de la cosecha del año 2001

En este caso tal y como se muestra en la Fig. 135 tampoco se diferencian los vinos por años de cosechas.

Una vez visto que no se obtuvieron diferencias mediante las técnicas de análisis no supervisado y que con los datos disponibles no fue posible clasificar las muestras atendiendo a su D.O., se descartó proseguir con el análisis quimiométrico mediante técnicas supervisadas ya que en éstas se precisa información acerca de la pertenencia de las muestras a un determinado grupo o categoría y en base a esta información construyen un modelo matemático de clasificación de las muestras en grupos, para a continuación usar este modelo para realizar la asignación de una muestra desconocida a un determinado grupo.

7.3- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos experimentales mostrados en las tablas 48, 51-53 (páginas. 93, 94, 103-108) se analizaron estadísticamente para correlacionar la concentración de cada compuesto con el origen geográfico del vino. El tratamiento quimiométrico aplicado a los datos obtenidos muestra que la concentración de compuestos fenólicos no sirve para identificar los vinos tintos analizados de acuerdo a su D.O ya que no se encontró ninguna correlación significativa. Estos resultados no nos sorprenden ya que se está hablando de D.O. cuyo ámbito geográfico está muy próximo entre sí, por lo que las condiciones del terreno, climáticas y de cultivo son similares. A todo esto además hay que añadir que la mayoría de los vinos analizados

en este trabajo son elaborados mayoritariamente con la variedad de uva Mencía. Esto concuerda además con los resultados obtenidos por otros autores como Gambelli y col. [211] que analizaron vinos tintos de dos regiones distintas de Italia y los resultados que obtuvieron muestran que la concentración de compuestos fenólicos en este caso no sirve para identificar los vinos según la D.O. a la que pertenecen. Pour Nikfardjam y col. [212] analizaron 67 vinos tintos húngaros elaborados con uvas de distintas variedades con el objetivo de caracterizarlos de acuerdo con su contenido polifenólico y antociánico. El análisis de componentes principales que realizaron, con los resultados que obtuvieron, reveló que no es posible distinguir entre las distintas variedades analizadas basándose en el contenido polifenólico.

Como se ha mencionado en diversas partes de este trabajo, tanto la cantidad como las distintas especies de compuestos fenólicos que aparecen en los vinos, dependen de un gran número de factores que podemos dividir en tres grupos: factores edafoclimáticos (composición del suelo, condiciones climáticas...), factores genéticos (variedad vinífera) y factores culturales (técnicas de vinificación...). En el presente trabajo se han analizado un total de 61 vinos tintos comerciales elaborados en su gran mayoría con uvas de la variedad vinífera Mencía y pertenecientes a tres zonas geográficas distintas pero próximas entre sí. Se desconoce cuales fueron los tratamientos enológicos utilizados por las distintas bodegas para la elaboración de dichos vinos, por lo que se puede concluir con que el tratamiento enológico tiene un efecto pequeño en el perfil polifenólico de los vinos tintos elaborados a partir de uvas de la variedad Mencía. Esto concuerda también con las investigaciones realizadas por Pérez-Lamela y col. [213], que estudiaron la influencia de la variedad de uva y de los distintos tratamientos enológicos en vinos tintos jóvenes del noroeste de España y llegaron a esa misma conclusión. Concluyeron asimismo que la variedad vinífera Mencía tiene un perfil antociánico similar a las variedades viníferas Brancellao y Sousón que también se cultivan en las regiones geográficas estudiadas.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos se puede concluir con que la concentración de compuestos polifenólicos no sirve para identificar vinos tintos gallegos de acuerdo a su denominación de origen.

8. CONCLUSIONES



8.1- CONCLUSIONES

1. Se investiga mediante HPLC la separación de compuestos polifenólicos utilizando tres columnas diferentes: Spherisorb ODS S5, Nova-Pak C₁₈ e Hypersil ODS. Los mejores resultados se obtienen con la columna Nova-Pak C₁₈. Se obtiene con esta columna un gradiente de elución adecuado para la identificación y cuantificación de 14 polifenoles flavonoides y no flavonoides.
2. La metodología analítica para HPLC/MS desarrollada en este trabajo, permite la identificación y cuantificación de 12 polifenoles flavonoides y no flavonoides.
3. El ácido gálico, encontrado en todos los vinos, fue el compuesto en mayor concentración seguido de epicatequina.
4. El ácido cafeico se encuentra mayoritariamente como ácido caftarico, encontrándose prácticamente (a excepción de dos) en todos los vinos analizados.
5. Los niveles mayores de polifenoles flavonoides cuantificados por HPLC/MS son en general el 3-monoglucósido de malvidina, seguido en mucha menor concentración por el 3-monoglucósido de peonidina y por el acetato del 3-monoglucósido de malvidina.
6. Los vinos pertenecientes a las denominaciones de origen Ribeiro y Valdeorras presentan una correlación mayor entre contenido de fenoles totales y actividad antioxidante que los vinos pertenecientes a la D.O. Ribeira Sacra.
7. Mediante técnicas de análisis no supervisado no se pueden establecer clasificaciones de los vinos estudiados atendiendo a su composición polifenólica.

9. BIBLIOGRAFÍA



9.1- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chipault J.R., Mizuno GR, Lundberg W.O. *Food Technol.* **10**, 209 (1956).
- [2] Leighton, F., Urquiaga, I. Polifenoles del vino y salud humana. *Dpto de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.* www.antioxidantes.com.ar.
- [3] Blackwelder, W.C. *Am. J. Med.* **68**, 164 (1980).
- [4] klatsky, A.L., Armstrong, M.A., Friedman, G.D. *Am. J. Cardiol.* **66**, 1237 (1990).
- [5] Rimm, E.B., Giovannucci, E.L., Willet, W.C. *Lancet* **336**, 464 (1991).
- [6] Doll, R., Peto, R. *Br. Med. J.* **310**, 470 (1995).
- [7] Fuchs, C.S., Stampfer, M.J., Colditz, G.A. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1245 (1995).
- [8] klatsky, A.L., Friedman, G.D. *Am. J. Public. Health* **85**, 16 (1995).
- [9] Keil, U., Chambless, L.E., Dsring, A., Filipiak, B., Stieber, J. *Epidemiology* **8**, 150 (1997).
- [10] Yuan, J.M., Ross, R.K., Gao, Y.T., Henderson, B.E., Yu, M.C. *Br. Med. J.* **314**, 18 (1997).
- [11] Renaud, S.C., Gueguen, Schenker, J., dOHountaud, A. *Epidemiology* **9**, 184 (1998).
- [12] Gaziano, J.M., Hennekens, C.H., Godfried, S.L. *Am. J. Cardiol.* **83**, 52 (1999).
- [13] St Leger, A.S., Cochrane, A.L., Moore, F. *Lancet* **1**, 1017 (1979).
- [14] Renaud, S., de Lorgeril, M. *Lancet* **339**, 1523 (1992).
- [15] Gronbaek, M., Deis, A., Sorensen, T. *Br. Med. J.* **310**, 1165 (1995).
- [16] Rimm, E.B., Klatsky, A., Grobbee, D., Stampfer, M.J. *Br. Med. J.* **312**, 713 (1996).

- [17] **Leighton, F., Urquiaga, I.** Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. *Conferencia pronunciada en el VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*. Mendoza, Argentina, 28 de noviembre al 3 de diciembre de 1999. www.fac.org.ar/faces/publica/revista/00v29n2/leighton/leighton.htm.
- [18] **Val, M.** Vino tinto, taninos y buena salud. www.sabormediterraneo.com/salud/salud_vinos.htm.
- [19] **Konowalchuk, J., Speirs, J.I.** *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 757 (1976).
- [20] **Masquelier, J.** *Cah. Nut. Diét* **5**, 57 (1979).
- [21] **Braquet, P., Monboise, J.C., Salvaire, R., Douste Blazy, L., Borel, J.P.** *CR Groupe Polyphenols* **11**, 496 (1982).
- [22] **Gendre, M.J., Laparra, J., Barraud, E.** *Ann. Pharm. Fr.* **43**, 61 (1985).
- [23] **Regnault-Roger, C.** *Cah Nutr Diét* **21**, 359 (1986).
- [24] **Masquelier, J., Dumon, M.C., Dumas, J.** *Acta Thérapeut* **7**, 101 (1981).
- [25] **Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S., Breteler, M.B.** *Rev. Neurol.* **153**, 185 (1997).
- [26] **Estruch, R.** Efectos beneficiosos del vino sobre el sistema cardiovascular: nivel de evidencia científica. *Servicio de Medicina Interna, Hospital Clinic, Barcelona*. www.rub.es/ace/dossier55b.htm.
- [27] **BOE** del 11 de Julio de 2003.
- [28] **DOG** del 11 Septiembre de 1996.
- [29] **BOE** del 25 de Septiembre de 1997.
- [30] **DOG** de 11 de Septiembre de 2002.
- [31] **DOG** de 21 de julio de 2006.

- [32] **BOE** de 24 de Febrero de 1976.
- [33] **DOG** del 28 de Abril de 2004.
- [34] **BOE** de 1 de Abril de 1977.
- [35] **DOG** del 18 de Febrero de 2000.
- [36] **Leandro Ibar**. Cómo se hace un buen vino. Manual completo de enología moderna. *Ed. De Vecchi S.A.* (1985).
- [37] **Mareca, I.** Origen, composición y evolución del vino. *Ed. Alambra*. Madrid (1981).
- [38] **De Miguel, M.** *Anales de Bromatología*, **31**, 131 (1996).
- [39] **Bourzeix, M.** *Vignes Vin*, Especial °1 (1975).
- [40] **Dumarzert, G.** *Ind. Aliment. Agric.* **91(1)**, 3 (1974).
- [41] **García Torroso, C., Ceta Torrijos, R., Perez Bustamante, J.A.** *Alimentación, equipos y tecnología*. 99 Sep.-Oct. (1985).
- [42] **Hidalgo, J.** Tratado de Enología. *Ediciones Mundi Prensa*. Madrid, Barcelona, México (2003).
- [43] **Ceta Torrijos, R.** Compuestos polifenólicos en los vinos: su importancia, su problemática analítica y su utilidad en el control y caracterización de los vinos. *1ª Xornadas Técnicas sobre aspectos Sanitarios e Hixiénicos nas bebidas alcohólicas*. Xunta de Galicia (1990).
- [44] **Ribéreau-Gayon, P.** *Ann. Physiol. Vég.* **6**, 211 (1964).
- [45] **Ribéreau-Gayon, P.** *Vinifera CR Acad. Sci.* **260**, 341 (1965).
- [46] **Ribéreau-Gayon**, *Traite d'oenologic. Sciencies et techniques du vin*, *Ed. Dunod*. Paris (1976).
- [47] **Ibrahim, R. K., Towers, G. H.** *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 125 (1960).

- [48] **Galvin, C.** *Thèse de Doctorat Enologie-Ampélologie*, Université de Bordeaux II (1993).
- [49] **Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H.** *J. Sci. Food Agric.* **29**, 403 (1978).
- [50] **Cheyrier, V., Basire, N., Rigaud, J.** *J. Agric. Food. Chem.* **37**, 1069 (1989).
- [51] **Cheyrier, Rigaud, J., Moutounet, M.** *J. Chromatography* **472**, 428 (1989).
- [52] **Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.J., Reminiac, C.C., Sapis, J.C.** *J. Agric. Food Chem.* **31**, 346 (1983).
- [53] **Boursiquot, J.M., Sapis, J.M., Macheix, J.J.** *CR Acad. Sci., Paris.* **302: Série III, n° 6**, 117 (1986).
- [54] **Langcake, P.** *Physiol. Plant Pathol.* **18 (2)**, 213 (1981).
- [55] **Waterhouse, A.L., Lamuela-Raventos, R.M.** *Phytochem.* **37**, 571 (1994).
- [56] **Hong, V. and Wrolstad, E.** *J. Agric. Food Chem.* **38 (3)**, 708 (1990).
- [57] **Lee, S. and Hong, V.** *J. Chromatogr.* **624**, 221 (1992).
- [58] **Renault, J.H., Thépenier, P., Zéches-Hanrot, M., Foucault, A.P.** *J. Liq. Chromatogra.* **18(8)**, 1663 (1995).
- [59] **Renault, J.H., Thépenier, P., Zéches-Hanrot, M., Le Men-Olivier, L., Durand, A., Foucault, A., Margraff, R.** *J. Chromatogr. A*, **763**, 345 (1997).
- [60] **Da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A., Horton, D.** *J. Chromatogr. A*, **799**, 321 (1998).
- [61] **Ribéreau-Gayon, P.** *Recherches sur les anthocynes des végétaux. Libr. Générale de l'Enseignement*, Paris (1959).
- [62] **Roggero, J.P., Rogonnet, B., Coen, S.** *Bull. Liaison Groupe Polyphénols*, **12**, 594 (1984).

- [63] **Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.E.** *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6202 (1978).
- [64] **Brouillard, R., El Hage Chahine, J.M.** *C.R. de l'Assemblée générale du Groupe Polyphénols*, **9**, Narbonne (1979).
- [65] **Amic, D., Davidovic-Amic, D.** *J. Chromatogr. A.* **65(3)**, 115 (1993).
- [66] **Larice, J.L., Archier, P., Rocheville-Divorne, C., Coen, S., Roggero, J.P.** *Rev. Fr. OEnol.* **121**, 7 (1989).
- [67] **Rigaud, J., Cheynier, V., Asselin, C., Brossaud, F., Moutonet, M.** Caractérisation des flavonoides de la baie de raisin. Aplication á une étude terroir. *In: OEnologie 95*, Lavoisier, Londres, Paris, New York, 137 (1996).
- [68] **Moutounet, M., Rabier, Ph., Puech, J.L., Verette, E., Barlliére, J.M.** *Sci. Aliments.* **9(1)**, 35 (1989).
- [69] **Vivas, N., Glories, Y.** *Rev. Fr. OEnol.* **142**, 33 (1993).
- [70] **Vivas, N., Glories, Y.** *Am. J. Enol Vitic.* **47**, 103 (1996).
- [71] **Pocock, K.F., Seftln, M.A., Williams, P.J.** *Am. J. Enol. Vitic.* **45(4)**, 429 (1994).
- [72] **Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N.** *Bull OIV*, **669670**, 1171 (1986).
- [73] **Ricardo Da Silva, J.M., Cheyner, V., Cheminat, A., Moutonet, M.** *Phytochem.* **30(4)**, 1259 (1991).
- [74] **Piretti, M.V., Ghedini, M., Serrazanetti, G.** *Annali di Chimica* **66**, 429 (1976).
- [75] **Lee, C.Y., Jaworski, A.W.** *Am. J. Enol. Vitic.* **41(1)**, 87 (1990).
- [76] **Weinges, K., Kaltenhausser, W., Marx, H.D., Nader, E., Nader, F., Perner, J., Seler, D.** *Justus Liebigs Ann. Chem.* **711**, 184 (1968).
- [77] **Thompson, R.S., Jacques, D., Haslam, E., Tanner, R.J.N.** *J.Chem. Soc. Perkins Trans. Part 1-1*, 1387 (1972).

-
- [78] **de Freitas, V.** *Thèse de Doctorat OEnologie-Ampélologie*, Université de Bordeaux II (1995).
- [79] **Bate-Smith, E.C.** *Food*, **23**, 124 (1954).
- [80] **Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M.** *Phytochem.* **36(3)**, 781 (1994).
- [81] **Souquet, I.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M.** *Phytochem.* **43(2)**, 509 (1996).
- [82] **Wulf, L.W., Nagel, C.W.** *J. Food Sci.* **45**, 479 (1980).
- [83] **Cheynier, Rigaud, J.** *Am. J. Enol. Vitic.* **37(4)**, 248 (1986).
- [84] **González-SanJosé, M.L., Barron, L., Díez, C.** *J. Sci. Food Agric.* **51**, 337 (1990).
- [85] **Nadal, M., Arola, L.** *Vitis* **34(3)**, 151 (1995).
- [86] **Glories, Y.** *Conn. Vigne Vin.* **18**, 195 (1984).
- [87] **Glories, Y.** *Conn. Vigne Vin.* **18**, 253 (1984).
- [88] **Glories, Y.** Recherches sur la matire colorante des vins rouges. *Tesis. Université de Bordeaux II* (1978).
- [89] **Somers, T.C.** *Phytochemistry* **10(9)**, 2175 (1971).
- [90] **Timberlake, C.F., Bridle, P.** *Am. J. Enol. Vitic.* **27(3)**, 97 (1976).
- [91] **Haslam, E.** *Phytochemistry* **19**, 2577 (1980).
- [92] **Baranowski, E.S., Nagel, C.W.** *Vitis*, **31**, 111 (1983).
- [93] **Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., Glories, Y.** *J. Sci. Food Agric.* **34**, 505 (1983).

-
- [94] **Bishop, P.D., Nagel, C.W.** *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1022 (1984).
- [95] **Singleton, V.L., Trousdale, E.K.** *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 63 (1992).
- [96] **Liao, H., Cai, Y., Haslam, E.** *J. Sci. Food Agric.* **59**, 299 (1992).
- [97] **Bakker, J., Picinelli, A., Bridle, P.** *Vitis* **32**, 111 (1993).
- [98] **Picinelli, A., Bakker, J., Bridle, P.** *Vitis* **33**, 33 (1994).
- [99] **Brouillard, R., Wigand, M.C.** *Phytochemistry* **29**, 3457-3460 (1990).
- [100] **Mistry, T.V., Cai, Y., Lilley, T.H., Haslam, E.** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1287 (1991).
- [101] **Dangles, O., Wigand, M.C., Brouillard, R.** *Bull. Liaison Groupe Polyphénols* **16**, 209 (1992).
- [102] **Brouillard, R., Dangles, O.** *Food Chem.* **51**, 365 (1994).
- [103] **Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., Brouillard, R.** *Phytochemistry* **41**, 301 (1996).
- [104] **Jurd, L.** *Tetrahedron* **23**, 1057 (1967).
- [105] **Jurd, L., Somers, T.C.** *Phytochemistry* **9**, 419 (1970).
- [106] **Somers, T.C.** *Phytochemistry* **10**, 2175 (1971).
- [107] **Santos-Buelga, C., Bravo-Haro, S., Rivas-Gonzalo, J.C.** *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 269 (1995).
- [108] **Baranowski, E.S., Nagel, C.W.J.** *Food Sci.* **48**, 419 (1983).
- [109] **Roggero, J.P., Archier, P., Coens, S., Rocheville-Divorne, C.** *Connaiss. Vigne Vin* **21**, 163 (1987).
- [110] **Rivas-Gonzalo, J.C., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C.** *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1444 (1995).

- [111] **Escribano-Bailón, T., Dangles, O., Brouillard, R.** *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1583 (1996).
- [112] **Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O.** *J. Sci. Food Agric.* **44**, 2402 (1996).
- [113] **Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O.** *J. Sci. Food Agric.* **70**, 493 (1996).
- [114] **Fulcrand, H., Docco, T., Es-Safi, N., Cheynier, V., Moutounet, M.** *J. Chromatogr. A* **752**, 85 (1996).
- [115] **Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C.** *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2262 (1997).
- [116] **ea, A.G.H.** Bitterness and astringency, the procianidins and fermented apple ciders. *En: Rousell. L. Rouseff (De.), Bitterness in Food and Beverages. Amsterdam: Elsevier, pp. 123-144* (1990).
- [117] **Noble, A.C.** Bitterness/Astringency in Wine. *En: Rousell. L. Rouseff (De.), Bitterness in Food and Beverages. Amsterdam: Elsevier, pp. 145* (1990).
- [118] **Glories, Y., Dournel, J.M.** Role de l'éthanal dans la complexation des tanins et des anthocyanes. *Rapport des Activités de Recherches, Institut d'Enologie de Bordeaux*, 86 (1984-86).
- [119] **Löwenthal, J.** *Z. Anal. Chem.* **16**, 33 (1877).
- [120] **Folin, O., Denis, W.** *J. Biol. Chem.* **12**, 239 (1912).
- [121] **Singleton, V. L., Rossi, J. A.** *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144 (1965).
- [122] **Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L.** *J. Agric. Food Chem.* **43**, 890 (1995).
- [123] **Urquiaga, I., Urzúa, U., Leighton, F.** Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. *8º Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites.* (1999).
- [124] **Sohal, R.S., Weindruch, R.** *Science.* **273**, 59 (1996).

- [125] **Chance, B., Sies, H., Boveris, A.** *Physiol. Rev.* **59**, 527 (1979).
- [126] **Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J.** *Food Technology*. 85 (1993).
- [127] **Bravo, L.** *Nutr. Rev.* **56**, 317(1998).
- [128] **Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H., German, J.B.** *J. Sci. Food Agric.* **70**, 55 (1996).
- [129] **Simonetti, P., Pietta, P., Testolin, G.** *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1152 (1997).
- [130] **Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C.** *J. Agric. Food Chem.* **46**, 361 (1998).
- [131] **Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna, O., Brighenti, F., Pietta, P.** *J. Agric. Food Chem.* **48**, 732 (2000).
- [132] **Larrauri, J.A., Sánchez-Moreno, C., Rupérez, P., Saura-Calixto, F.** *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1603 (1999).
- [133] **Burns, J., Gardner, P.T., O'Neill, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D.B., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M.R., Lean, M.E., Duthie, G.C., Crozier, A.** *J. Agric. Food Chem.* **48**, 220 (2000).
- [134] **Leighton, F., Urquiaga, I.** Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. *VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*. Mendoza, Argentina, 28 de noviembre al 3 de diciembre de 1999.
- [135] **Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F.** *Analytical Sciences* **17**, 599 (2001).
- [136] **Rice-Evans, C., Miller, N. J.** *Method in Enzymology*, **234**, 279 (1994).
- [137] **Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.** *FEBS Lett.* **187**, 33 (1985).
- [138] **Sánchez-Moreno, C.** *Viticultura/Enología Profesional* **80**, 37 (2002).

- [139] **Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, J., Bobet, R.** *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7548 (2002).
- [140] **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.** *Lebensm.-Qwiss.u-Technol.* **28**, 25 (1995).
- [141] **Arnao, M.N., Cano, A., Acosta, M.** *Recen. Res. Devel. in Agricultural and Food Chem.* 2893 (1998).
- [142] **Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., Saija, A.** *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4718 (1999).
- [143] **Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W.** *Food Chemistry* **66**, 401 (1999).
- [144] Antioxidantes y calidad de vida, nº 0 (1994).
- [145] **Ribereau-Gayon, P. and Stonestreet.** *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649 (1965).
- [146] **Somers, T. C., Evans, M. E.** *J. Sci. Food Agric.* **28**, 279 (1977).
- [147] **Swain, T., Hillis, E.** *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63 (1959).
- [148] **Bakker, J., Preston, N. W., Timberlake, C. F.** *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 121 (1986).
- [149] **Williams, M., Hrazdina, G., Wilkinson, M. M., Sweeny, J. G., Iacobucci, G. A.** *J. Chromatogr.* **155**, 389 (1975).
- [150] **Wulf, L. W., Nagel, C. W.** *Am. J. Enol. Vitic.* **29**, 42 (1978).
- [151] **Bakker, J., Timberlake, C.F.** *J. Sci. Food Agric.* **36**, 1315 (1985).
- [152] **Roggero, J.P., Larice, J.L., Rocheville-Divorne, C., Archier, P., Coen, S.** *Rev. Franc. Oenol.* **112**, 41 (1988).
- [153] **Eder, R., Wendelin, S., Barna, J.** *Mitt. Klosterneuburg*, **40**, 68 (1990).

- [154] Santos, C., Muñoz, S.S., Gutierrez, Y., Hebrero, E., Vicente, J.L., Galindo, P., Rivas, J.C. *J. Agric. Food Chem.* **39**(6), 1086 (1991).
- [155] Castia, T., Franco, M.A., Mattivi, F., Muggioli, G., Sferlazzo, G., Versini, G. *Sci. Aliments*, **12**, 239 (1992).
- [156] Holbach, B., Marx, R., Ackermann, M. *Lebensm.-Chem.* **51**, 78 (1997).
- [157] Roggero, J.P., Coen, S., Ragonett, B. *Am. J. Enol. Vitic.* **37** (1), 77 (1986).
- [158] Hebrero, E., Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J.C., *Am. J. Enol. Vitic.* **39**(3), 227 (1988).
- [159] Thompson, B. A., Iribarne, J. V., Dziedzic, P. J. *Anal. Chem.* **54**, 2219 (1982).
- [160] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **57**, 675 (1985).
- [161] Bruins, A. P., Covey, T. R., Henion, J. D. *Anal. Chem.* **59**, 2642 (1987).
- [162] Glässgen, W. E., Seitz, H. U., Metzger, J. W. *Biol. Mass Spectrom.* **21**, 271 (1992).
- [163] Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W. *J. Food Sci.* **65**, 357 (2000).
- [164] Rapisarda, P., Fanella, F., Maccarone, E. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2249 (2000).
- [165] Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L.E., Griffin, d., Wrolstad, R. E. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4657 (1999).
- [166] Berente, B., García, D. de la C., Reichenbacher, M., Danzer, K. *J. Chromatogr. A* **871**, 95 (2000).
- [167] Merken, H. M., Beecher, G. R. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 577 (2000).
- [168] Smith, R. D., Loo, J. A., Loo, R. R. O., Busman, M. *Mass Spectrom. Rev.* **10**, 359 (1991).

- [169] **Shelby, R. A., Olsovska, J., Havlicek, V., Flieger, M. J.** *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4674 (1997).
- [170] **Snyder, A. P.** Electrospray: a popular ionization technique for mass spectrometry. In *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Snyder, P., Ed., ACS Symposium Series 619: American Chemical Society: Washington, DC, (1995); Chapter I.
- [171] **Covey, T.** Analytical characteristics of the electrospray ionization process. In *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Snyder, P., Ed., ACS Symposium Series 619: American Chemical Society: Washington, DC, (1995); Chapter II.
- [172] **Careri, M., Mangia, A., Musci, M. J.** *Chromatogr. A* **794**, 263 (1998).
- [173] **Mauri, P., Pietta, P. J.** *Pharm. Biomed. Anal.* **23**, 61 (2000).
- [174] **Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Casetta, B. J.** *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2104 (1995).
- [175] **Revilla, I., Pérez-Magariño, S., González-San José, M.L., Beltrán, S. J.** *Chromatogr. A*, **847**, 83 (1999).
- [176] **Cela, R.** Avances en Quimiometría Práctica. Universidad de Santiago de Compostela (1994).
- [177] **Chandra, A., Jatinder, R., Yingqin, Li. J.** *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3515 (2001).
- [178] **Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P. J.** *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5736 (2001).
- [179] **Salagoity-Auguste, M.H., Bertrand, A. J.** *Sci. Food Agric.* **35**, 1241 (1984).
- [180] **Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., Lanaridis, P.** *Food Chemistry*, **99**, 784 (2006).
- [181] **Fernando Zamora Marín.** Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones y Mundi-Prensa (2003).

- [182] **Meiriño Castro, D.** Estudio de los ácidos y aldehidos fenólicos de diversos vinos monovarietales de la Comunidad Autónoma de Galicia. Tesis de licenciatura, USC Julio 1990.
- [183] **Guillén Sánchez, D.A.** Estudio del fraccionamiento previo al HPLC en el análisis de polifenoles del vino de Jerez. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz.
- [184] **Hebrero, E., García Rodríguez, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C.** *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 283 (1989).
- [185] **Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E.M., de Pascual Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J.C.** Contribution to the pigments responsible for the browning in anthocyanin-flavanol solutions. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung.*, in press (1999).
- [186] **Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O.** *J. Sci. Food Agric.* **70**, 493- (1996).
- [187] **Santos-Buelga, C., Vivar-Quintan, A., Rivas-Gonzalo, J.C.** Proceedings of 4th Symposium of Vitiviniculture of Alentejo, Evora, Portugal. Mayo, pág. 207 (1998).
- [188] **Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P.J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Favre-Bonvin, J.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 735 (1996).
- [189] **Bakker, J., Bridle, P., Honda, T., Kuwano, H., Saito, N., Terahara, N., Timberlake, C.F.** *J. Agric. Food Chem.* **45**, 35 (1997).
- [190] **Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J.M., Cheynier, V., Moutounet, M.** *J. Food Sci.* **61**, 938 (1996).
- [191] **Morata, A., Calderón, F., González, M.C., Gómez-Cordovés, M.C., Suárez, J.A.** *Food Chemistry*, **100**, 1144 (2007).
- [192] **Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M.** *Phytochemistry*, **47 (7)**, 1401 (1998).
- [193] **Ough, C. S., Amerine, M. A.** Methods for analysis of must and wine. 196-221.
- [194] **Vinson, J., Hontz, B.** *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 401 (1995).

- [195] **Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura Calixto, F. J.** *Science of Food and Agriculture*, **79**, 1301 (1999).
- [196] **Vasanth, H.P., Clegg, S.** *J. Food Composition and Analysis*, **20**, 133 (2007)
- [197] **Cliff, M.A., King, M.C., Schlosser, J.** *Food Research International*, **40**, 92 (2007).
- [198] **Arnous, A.; Makris, D.P., Kefalas, P.** *J. Food Composition and Analysis*, **15**, 655 (2002).
- [199] **Meloun, M., Milytyk, J., Forina, M.** *Chemometrics for analytical chemistry*. **1**, Chichester: Ellis Horwood (1992).
- [200] **Forina, M., Lanteri, S.** *Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry*. 305 (1984).
- [201] **Meloun, M., Milytyk, J., Forina, M.** Scaling weightind and transforms. En *Chemometrics for analytical chemistry*. Vol. 1. Ellis Horwood Chichester, New York, 212 (1992).
- [202] **Hagenmaier, H., Lindig, C., She, J.** *Chemosphere*, **29**, 2163 (1994).
- [203] **Rebolo, S., Peña, R.M., Latorre, M.J., García, S., Botana, A.M., Herrero, C.** *Anal. Chim. Acta*, **417**, 211 (2000).
- [204] **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, M.A.P., Holzapfel, V.H., Pérez-Pulido, R., Martínez, M., Gálvez, A.** *Syst. Appl. Microbiol.*, **27**, 118 (2004).
- [205] **Huetting, J., Oehme, M.** *J. Environ. Monitor*, **7**, 319 (2005).
- [206] **Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers, J.** Fractional Factorial Desingsns. En *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Part A. Elsevier, Amsterdam, 697 (1997).
- [207] **Pearson, k.** *Phil. Mag.*, Ser B, **2**, 559 (1901).
- [208] **Hotelling, H.** *J. Educ. Psychol.*, **24**, 417, 498 (1933).

-
- [209] **Ortíz, M. C., Sarabia, L. A.** Componentes principales y correspondencias. En R. Cela Editor *Avances en quimiometría práctica*. Imprenta Universitaria, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 241 (1994).
- [210] **Ward, J. J.** *Ann. Stat. Ass.*, **58**, 236 (1963).
- [211] **Gambelli, L., Santaroni, G.P.** *J. Food Composition and Analysis*, **17**, 613 (2004).
- [212] **Pour Nikfardjam, M.S., Márk, L., Avar, P., Figler, M., Robert, O.** *Food Chemistry*, **98**, 453 (2006).
- [213] **Pérez-Lamela, C., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., Orriols-Fernández, I.** *Food Chemistry*, **101**, 601 (2007).